

Epigenetische und angiogenetische Veränderungen beim klinisch lokalisierten Prostatakarzinom

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biochem. Isabel Steiner

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. rer. nat. Andreas Herrmann

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Andreas Herrmann

2. Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler

3. Prof. Dr. med. Michael Lein

Tag der mündlichen Prüfung: 31.Oktober 2012

Meinem Vater
Dr. rer. nat. Jürgen Steiner
gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Summary	VII
Zusammenfassung	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Die Prostata.....	1
1.1.1 Erkrankungen der Prostata.....	3
1.1.1.1 Das Prostatakarzinom	3
1.1.1.1.1 Diagnostik des Prostatakarzinoms	4
1.1.1.1.2 Klassifikation.....	5
1.1.1.1.3 Therapeutische Maßnahmen	6
1.1.1.1.4 Vorhandene Biomarker zur Früherkennung.....	8
1.2 Epigenetik in der Tumorentwicklung.....	9
1.2.1 DNA-Methylierung.....	9
1.2.2 Methylierungsfeldeffekt	11
1.2.3 Interessante Gene zur Bestimmung des Methylierungsfeldeffektes	12
1.2.4 Demethylierung als Therapie.....	14
1.3 Die Mikrogefäßdichte beim Prostatakarzinom	15
1.3.1 Endotheliale Faktoren	16
1.3.1.1 CD-Moleküle der endothelialen Oberfläche	16
1.3.1.2 VEGFA und VEGFR2: wichtige Faktoren der Angiogenese	17
1.3.1.3 Caveolin-1 (CAV1)	17
1.4 Fragestellung.....	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Verwendetes Gewebe	22
2.1.2 Verwendete Oligonukleotide.....	22
2.1.3 Verwendete Antikörper.....	22
2.1.4 Verwendete Vektoren und Bakterienstämme.....	22
2.1.5 Substanzen/Chemikalien/Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.6 Verwendete Kits	23
2.1.7 Geräte	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Zellbiologische Methoden	25
2.2.1.1 Kultivierungsbedingungen humaner Zelllinien	25
2.2.1.2 Isolation stromaler Zellen aus prostatistischem Primärgewebe.....	26
2.2.1.3 Bestimmung der Proliferation mittels XTT.....	26
2.2.1.4 Inkubation der LNCaP-Zelllinie mit 5-Aza-2-desoxycytidin	26
2.2.1.5 Inkubation der LNCaP-Zelllinie mit Trichostatin A (TSA)	27
2.2.1.6 Behandlung von HUVEC mit Wachstumsfaktoren	27
2.2.1.7 Ko-Kultivierung von HUVEC mit konditionierten Zellkulturüberständen.....	27
2.2.1.8 Transfektion humaner Zelllinien mit Plasmid-DNA.....	28
2.2.1.9 Transfektion von PC-3 mit siRNA	28
2.2.1.10 Luziferase-Reporter-Gen-Assay	28
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	29
2.2.2.1 RNA-Isolation aus gefrorenem Gewebe und Zelllinien	29
2.2.2.2 Isolation genomischer DNA aus Formalin-fixiertem Gewebe und Zelllinien	30
2.2.2.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	30

2.2.2.4	Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA	30
2.2.2.5	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)	31
2.2.2.5.1	Genexpressionsanalysen mittels Universal Probe Library (UPL)-Sonden.....	31
2.2.2.5.2	Ermittlung der Expressionseffizienz	31
2.2.2.5.3	Durchführung der RT-qPCR	32
2.2.2.5.4	Auswertung der RT-qPCR-Ergebnisse.....	32
2.2.2.6	Quantifizierung der Gen-Promotor-Methylierung.....	33
2.2.2.6.1	Natriumbisulfit-Behandlung genomischer DNA	33
2.2.2.6.2	Quantifizierung der GSTP1-Promotormethylierung.....	34
2.2.2.6.3	Quantifizierung der PITX2-Promotormethylierung	34
2.2.2.6.4	Quantifizierung der RAR β 2- und APC-Promotormethylierung.....	35
2.2.2.6.5	MethylProfiler-Analyse.....	35
2.2.2.7	Agarosegelelektrophorese	36
2.2.2.8	Klonierung	36
2.2.2.8.1	TOPO-TA-Klonierung	37
2.2.2.8.2	Zero Blunt TOPO-TA-Klonierung.....	37
2.2.2.8.3	Klonierung der Promotor-Plasmid-Konstrukte.....	37
2.2.2.8.4	Klonierung des pcDNA3.1(-)-CAV1-Expressionsvektors	38
2.2.2.9	Mini-PCR.....	38
2.2.2.10	Isolierung der Plasmid-DNA	39
2.2.2.11	Analytischer Restriktionsverdau	39
2.2.2.12	Sequenzierung.....	39
2.2.2.13	Bisulfit-Sequenzierung	39
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	40
2.2.3.1	Proteinisolierung mittels Ripa-Puffer.....	40
2.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bradford	40
2.2.3.3	Western Blot (Semi Dry Blotting).....	40
2.2.3.4	MMP2- und MMP9-Aktivitätsbestimmung mittels Zymographie.....	41
2.2.4	Immunhistochemische Untersuchungen.....	42
2.2.4.1	Erstellung eines Tissue-Mikroarray (TMA)	42
2.2.4.2	Hämatoxylin/Eosin (H&E)-Färbung	43
2.2.4.3	Immunhistochemie mittels der LSAB-Methode.....	43
2.2.4.4	Bestimmung der Mikrogefäßdichte (MVD).....	44
2.2.5	Statistische Auswertung	44
2.2.5.1	Receiver Operating Characteristic (ROC)-Analyse.....	44
2.2.5.2	Univariate Kaplan-Meier-Überlebensanalyse	45
3	Ergebnisse	46
3.1	DNA-Promotor-Hypermethylierung beim Prostatakarzinom	46
3.1.1	Untersuchung des Methylierungsfeldeffektes in der Prostata.....	46
3.1.2	Genpromotor-Methylierung als Progressionsmarker	50
3.1.3	RAR β 2-Methylierung als möglicher Marker zur frühen Diagnose des PCa	50
3.1.4	MethylProfiler-Screening zur Ermittlung methylierter Gene im Prostatakarzinom	53
3.2	Untersuchungen zur Angiogenese als Marker des Prostatakarzinoms.....	57
3.2.1	Charakteristika des verwendeten Patientenkollektivs	57
3.2.2	Genexpression Endothel-assoziiierter Faktoren im prostatistischen Gewebe.....	57
3.2.3	RNA-Expression und pathologische Parameter	60
3.2.4	Diagnostisches Potenzial Endothel-assoziiierter Faktoren.....	61
3.2.5	Überlebensanalyse zur Abschätzung der prognostischen Relevanz.....	62
3.2.6	Ermittlung der intratumoralen Mikrogefäßdichte im prostatistischen Gewebe	63
3.2.7	Immunhistochemische Ermittlung der VEGFA-Expression	66
3.2.8	Korrelation der immunhistochemischen MVD mit der mRNA-Expression.....	67
3.2.9	Immunhistochemische Analyse von CAV1 auf Großflächenschnitten.....	67
3.2.10	CAV1-Expression in Lymphknotenmetastasen	69
3.2.11	CAV1-Expression in prostatistischen Zelllinien.....	70
3.2.12	CAV1-Expression in ko-kultivierten HUVEC-Zellen	71
3.2.13	Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die endotheliale CAV1-Expression	73

3.2.14	CAV1-mRNA-Expression im prostatistischen Gewebe.....	74
3.2.15	DNA-Promotormethylierung und CAV1-Expression	75
3.2.16	CAV1-Reexpression durch Demethylierung.....	79
3.2.17	Promotor-Reportergen-Analysen	80
3.2.18	Einfluss der CAV1-Expression auf die Metalloproteinasen MMP2 und MMP9	82
4	Diskussion	84
4.1	Der epigenetische Feldeffekt im prostatistischen Gewebe	84
4.2	MethylProfiler-Studie: Interessante Gene und deren diagnostisches Potenzial	87
4.3	Endotheliale Faktoren im prostatistischen Gewebe.....	91
4.4	CAV1 als Marker des Prostatakarzinoms	93
4.5	CAV1 in endothelialen Zellen	96
4.6	CAV1 und dessen Einfluss auf die Metalloproteasen MMP2 und -9	98
4.7	Methylierung im CAV1-Gen	99
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	101
6	Literaturverzeichnis	105
7	Anhang.....	124
7.1	TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms.....	124
7.2	Oligonukleotide.....	125
7.3	Vektorkarten	126
7.4	Rezepte	127
7.5	Sequenz des CAV1-Promotors für Luziferase-Reportergen-Assays	129
7.6	Sequenz des CAV1-Promotors nach Bisulfit-Behandlung für Bisulfitsequenzierung	130
7.7	Kodierende Sequenz von CAV1 für Überexpression in LNCaP	130
7.8	Informationen zu den verwendeten Genen	131
7.9	Effizienzen und Präzision der RT-qPCR-Messungen (Intra-Assay-Variation)	131

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Schematische Darstellung der Lage der Prostata im männlichen Urogenitaltrakt sowie Einteilung der Zonen der Prostata.....	2
Abb. 1-2: Schematische Darstellung des Gleason-Systems.....	5
Abb. 1-3: Schematische Darstellung der Expressionsregulation durch CpG-Methylierung	11
Abb. 1-4: Angiogenese in der Tumorentwicklung	16
Abb. 1-5: Struktur von Caveolae und dem Integralmembranprotein CAV1	18
Abb. 2-1: Schematische Darstellung der Modifizierung unmethylierter Cytosine durch die Behandlung mit Natriumbisulfit.....	33
Abb. 2-2: Herstellung eines Tissue Mikroarrays anhand einer Stanzapparatur.....	42
Abb. 3-1: Untersuchung des Methylierungsfeldeffektes von GSTP1, RAR β 2, APC und PITX2	49
Abb. 3-2: Assoziationen der Genpromotor-Methylierung mit (A) pT-Stadium und (B) primärem Gleason-Grad (3 und 4) im prostatiscen Normal- und Tumorgewebe	50
Abb. 3-3: RAR β 2-Methylierung im isolierten Tumor- und korrespondierendem tumor-angrenzenden Normalgewebe	52
Abb. 3-4: Assoziationen der RAR β 2-Methylierung mit pT-Stadium bzw. primärem Gleason-Grad des neuen Patientenkollektivs	53
Abb. 3-5: MethylProfiler-Studie zur Ermittlung veränderter Methylierungsraten von 24 Genen im prostatiscen Gewebe.....	55
Abb. 3-6: mRNA-Expression endothelialer Faktoren im gepaarten prostatiscen Normal- und Tumorgewebe	58
Abb. 3-7: Die CAV1-mRNA-Expression assoziiert invers mit Tumorausdehnung und –Grading im prostatiscen Gewebe	60
Abb. 3-8: Receiver Operating Characteristic (ROC)-Analyse zur Ermittlung der diagnostischen Aussagekraft der CAV1-Expression im prostatiscen Normal- und Tumorgewebe	62
Abb. 3-9: Signifikant schlechteres Überleben bei Patienten mit geringer CAV1-mRNA-Expression.....	63
Abb. 3-10: Visualisierung der Mikrogefäße im prostatiscen Gewebe durch Verwendung eines monoklonalen CD31- bzw. CD34-Antikörpers.....	64
Abb. 3-11: Bestimmung der Mikrogefäßdichte anhand der Faktoren CD31, CD34 und CAV1 und ihre Korrelation.....	65
Abb. 3-12: Einteilung der epithelialen VEGFA-Proteinexpression anhand repräsentativer PCa-Bereiche mit schwacher, mittlerer sowie starker epithelialer Proteinexpression.....	66
Abb. 3-13: CAV1-Proteinexpression im histologisch gesund erscheinendem Normal- und Tumorgewebe ...	68
Abb. 3-14: Immunhistochemische Analyse der CAV1-Proteinexpression in Metastasen des Lymphknotens..	69
Abb. 3-15: CAV1-Proteinexpression in gängigen prostatiscen Zelllinien und isolierten Epithelzellen aus prostatiscen Normal- bzw. Tumorbereichen.....	70
Abb. 3-16: CAV1-Proteinexpression in primären, prostatiscen Stromazellen, isoliert aus gesunden und tumoralen Bereichen der Prostata	71
Abb. 3-17: Ko-Kultivierung von HUVEC-Zellen mit konditionierten Zellüberständen von BPH-1, PC-3 und primären Stromazellen aus gesunden und tumorösen Bereichen der Prostata	72
Abb. 3-18: Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die CAV1-Proteinexpression in HUVEC-Zellen	73
Abb. 3-19: CAV1-mRNA-Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe	75
Abb. 3-20: Schematische Darstellung des CAV1-Promotorbereiches mit den zu untersuchenden sieben CpG-Dinukleotiden sowie experimentelle Vorgehensweise	76
Abb. 3-21: Zusammenfassende Darstellung der Methylierungszustände der 7 CpG-Dinukleotide im CAV1-Promotor bei Gegenüberstellung von prostatiscem Tumor- und tumorangrenzenden Normalgewebe	78
Abb. 3-22: CAV1-mRNA-Reexpression durch 5-Aza-2-desoxycytidin.....	80
Abb. 3-23: Promotor-Reportergen-Assay.	81
Abb. 3-24: Beeinflussung der MMP2- und MMP9-Aktivität durch CAV1.....	83

Abb. 5-1: Einordnung der epigenetischen Methylierung, der MVD sowie des CAV1 im Kontext ihres Markerpotenzials beim Prostatakarzinom.	103
Abb. 7-1: Verwendete Vektoren mit den jeweiligen Sequenzreferenzpunkten	126

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1:	Übersicht der in dieser Dissertation verwendeten humanen Zelllinien	25
Tab. 3-1:	Charakteristika der Tumorgewebeproben und des tumorfreien Kontrollgewebes, sowie Angaben der Distanzen der entnommenen tumorangrenzenden Normalgewebe aller untersuchten Patienten	47
Tab. 3-2:	Charakteristika der verwendeten Patienten zur weiteren Analyse der RAR β 2-Promotor-methylierung	51
Tab. 3-3:	Charakteristika der analysierten Patienten für die MethylProfiler-Studie.....	53
Tab. 3-4:	Übersicht der Gene, die anhand der MethylProfiler-Studie auf ihren Methylierungsstatus untersucht wurden	54
Tab. 3-5:	Charakteristika des verwendeten Patientenkollektivs sowie zugehörige pathologische Klassifizierung.....	57
Tab. 3-6:	Relative Expressionsunterschiede Endothel-assoziiierter Faktoren zwischen Tumor- und Normalbereichen im prostatiscen Gewebe von 69 Patienten nach radikaler Prostatektomie...	59
Tab. 3-7:	Spearman-Korrelationsmatrix der Expressionen Endothel-assoziiierter Faktoren	60
Tab. 3-8:	Ergebnisse der Receiver Operating Characteristic (ROC)-Analyse aller untersuchten Endothel-assoziierten Faktoren zur Bewertung der Diskriminierung von Tumor- und tumorangrenzendem Prostatagewebe.....	61
Tab. 3-9:	Ausprägung der MVD im untersuchten Prostatakarzinomgewebe im TMA-Format	64
Tab. 3-10:	Übersicht zur MVD-Auswertung mittels CD31, CD34 bzw. CAV1 am TMA	65
Tab. 3-11:	Bisulfit-Sequenzierung von genomischer DNA, isoliert aus prostatiscem Normal- und Tumorgewebe von 6 Patienten	77
Tab. 3-12:	Bisulfit-Sequenzierung von genomischer DNA aus prostatiscen Zelllinien	79
Tab. 7-1:	TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms	124
Tab. 7-2:	Oligonukleotide und Sonden für mRNA-Expressionsanalysen	125
Tab. 7-3:	Oligonukleotide für Bisulfit-Sequenzierung der CAV1-Promotorregion.....	125
Tab. 7-4:	Oligonukleotide für Luziferase-Reporter-Gen-Assays	125
Tab. 7-5:	Oligonukleotide für die Klonierung der kodierenden Sequenz von CAV1.....	125
Tab. 7-6:	Oligonukleotide und Sonden für methylierungsspezifische PCR.....	126
Tab. 7-7:	Puffer für Proteinisolierung und SDS-PAGE.....	127
Tab. 7-8:	Puffer für immunhistochemische Analysen.....	127
Tab. 7-9:	Puffer für Zymographie	128
Tab. 7-10:	Pipettierschema für Acrylamidgele für die SDS-PAGE.....	128
Tab. 7-11:	Pipettierschema für Gelatine-haltige Acrylamidgele für die Zymographie	129
Tab. 7-12:	Name, Referenznummer, sowie mRNA-Größen aller untersuchten Gene.....	131
Tab. 7-13:	Effizienzen und Präzision der RT-qPCR-Messungen	131

Summary

Prostate cancer is the most common disease of men in western countries. Although the prostate-specific antigen PSA is used as a tumor marker since the 1980s, it is not a 100% reliable factor for predicting a tumor lesion, as an increased serum PSA level may also be present in benign enlargement (BPH) or inflammation of the prostate. Another problem also lies in the evaluation of core biopsies, which are often false-negative because of missing the tumor. Thus, reliable predictors of prostate carcinoma are clearly needed ensuring the right procedures of further therapies.

The main focus of this thesis was to evaluate possibilities to find suitable molecular biomarkers for prostate cancer with a focus on the diagnosis on small tissue cores simulating the conventional punch biopsy procedure. First, the epigenetic methylation in the GSTP1, RAR β 2, APC and PITX2 promoters, respectively, in terms of a possible field effect was studied. In particular, the hypermethylation of the RAR β 2 promoter could be determined as a possible tumor marker for tumor prediction even in tumor adjacent normal tissue. GSTP1 showed a highly specific methylation pattern in the tumor, which underlines its diagnostic potential. Additionally, the promoter hypermethylation correlated with pathological parameters such as pT stage and primary Gleason grade, demonstrating its importance in tumor progression. The screening of 24 genes using the MethylProfiler assay identified additional genes whose promoter hypermethylation patterns might be important for prostate cancer diagnosis.

In addition to epigenetic methylation as a diagnostic tool, another focus of this thesis was the investigation of angiogenic and endothelial-associated factors that could be used as markers of prostate cancer development. The immunohistochemically determined microvessel density by CD31 and CD34 proved to be an important factor in tumor progression because of its associations with pathological parameters. To identify possible differences in the expression of selected endothelial and angiogenic factors (CD31, CD34, CD105, CD144, CD146, VEGFA, VEGFR2 and CAV1, respectively) in tumor and tumor-adjacent normal tissue, gene expression analysis was carried out and demonstrated a significant reduction mainly in the tumoral CAV1 mRNA content. Furthermore, loss of CAV1 mRNA associated significantly with pathological parameters and showed prognostic relevance underlining the importance of CAV1 gene expression in prostate cancer development.

Bisulfite sequencing analysis of seven CpG dinucleotides located in the CAV1 promoter showed differential methylation patterns between tumor and tumor-adjacent normal tissue which could lead to a downregulation of CAV1 transcription. The hypothesis was supported by a reexpression of the gene at the mRNA level after 5-Aza-2-deoxycytidine treatment of CAV1-negative LNCaP cells.

In immunohistochemical studies, CAV1 was predominantly localized in the prostatic stroma and 12/64 cases showed reduced staining in tumoral stromal and endothelial cells compared to normal counterparts. To investigate a possible influence of CAV1 expression by paracrine mechanisms (growth factors) in endothelial cells from umbilical veins (HUVEC), the cells were co-cultured with conditioned media of PC-3 cells (or stromal cells of the tumor area) resulting in a significantly reduced endothelial CAV1 expression. Treatment with VEGFA resulted in an increased endothelial expression of CAV1, suggesting an involvement of CAV1 in the angiogenic process. Furthermore, a putative influence of MMP2 and MMP9 activity by CAV1 was not found after CAV1 downregulation or CAV1 overexpression suggesting no involvement of CAV1 in MMP2- and MMP9-regulated processes.

The results of this thesis demonstrate that epigenetic and angiogenic processes play important roles in diagnosis, prognosis and progression in prostate cancer. Especially the CAV1 mRNA expression seems to be an important factor providing valuable information and its marker potential should be investigated in future.

Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist in den westlichen Ländern die häufigste bösartige Erkrankung des Mannes. Obwohl das Prostata-spezifische Antigen PSA seit den 1980er Jahren als Marker dieser Tumorentität genutzt wird, stellt es keinen hundertprozentig zuverlässigen Faktor zur Vorhersage eines Tumorherdes dar, da ein erhöhter Serum-PSA-Wert auch bei einer gutartigen Vergrößerung (BPH) oder einer Entzündung vorliegen kann. Ein weiteres Problem liegt zudem in der Beurteilung von Stanzbiopsien, die häufig aufgrund der Tumorverfehlung falsch negativ bewertet werden. Neue Marker, die eine verlässliche Vorhersage eines Tumors der Prostata treffen können, sind daher zwingend notwendig, um dem Patienten eine auf ihn abgestimmte Therapie zukommen zu lassen.

Im Fokus dieser Dissertation stand die Evaluierung molekularer Möglichkeiten zur Findung geeigneter Biomarker für das Prostatakarzinom mit Schwerpunkt der Diagnostik kleiner Gewebstanzen, die die herkömmliche Stanzprozedur simulierten. Dabei wurde zunächst die epigenetische Methylierung in Promotorbereichen der Gene GSTP1, RAR β 2, APC und PITX2 im Hinblick eines möglichen Methylierungsfeldeffekts untersucht. Besonders die Methylierung des RAR β 2-Promotors konnte dabei als möglicher Marker zur Tumovorhersage bei Untersuchung von Tumor- und tumorangrenzenden Normalgewebe bestimmt werden. GSTP1 zeigte eine äußerst spezifische Methylierung im Tumor, was dessen diagnostisches Potenzial unterstreicht. Die Methylierung korrelierte zusätzlich mit pathologischen Parametern wie pT-Stadium und primärem Gleason-Grad, was ihre Bedeutung in der Tumorprogression verdeutlicht. Das Screening von 24 Genen anhand des MethylProfiler-Assays konnte weitere Gene identifizieren, deren Promotorhypermethylierung eine mögliche zukünftige Bedeutung in der Prostatakarzinomdiagnostik aufweisen könnten.

Neben der epigenetischen Methylierung als diagnostisches Werkzeug lag ein weiterer Schwerpunkt dieser Dissertation in der Untersuchung von angiogenetischen und Endothel-assoziierten Faktoren, die als Marker der Prostatakarzinomentwicklung herangezogen werden könnten. Die immunhistochemisch durch CD31- und CD34-Markierung ermittelte Mikrogefäßdichte erwies sich dabei als bedeutender Faktor der Tumorprogression, da sie mit pathologischen Parametern korrelierte. Genexpressionsanalysen von Tumor- und tumorangrenzendem Normalgewebe zur Identifizierung möglicher Unterschiede in der Expression ausgewählter endothelialer und angiogenetischer Faktoren (CD31, CD34, CD105, CD144, CD146, VEGFA, VEGFR2 und CAV1) ergaben vor allem Unterschiede im CAV1-mRNA-Gehalt, der im Tumorgewebe bei Vergleich mit tumorangrenzendem Normalgewebe deutlich verringert war. Assoziationen mit pathologischen Parametern und prognostische Relevanz konnten zusätzlich nachgewiesen werden und unterstreichen die Bedeutung der CAV1-Genexpression in der Prostatakarzinomentwicklung. Bisulfit-Sequenzierungsanalysen von sieben CpG-Dinukleotiden im CAV1-Promotor ergaben differenzielle Methylierungsmuster zwischen Tumor- und tumorangrenzendem Gewebe, die zu einer Herunterregulierung der Transkriptmenge führen könnten. Die Hypothese konnte zusätzlich durch den Nachweis einer Reexpression des Gens auf mRNA-Ebene durch 5-Aza-2-desoxycytidin-Behandlung von CAV1(-)-LNCaP Zellen gestützt werden.

Immunhistochemische Untersuchungen lokalisierten CAV1 überwiegend im Stroma des prostatistischen Gewebes, wobei in 12/64 untersuchbaren Fällen eine deutliche Verringerung der Proteinexpression in endothelialen Zellen und Fibroblasten ausgemacht werden konnte. In vitro Ko-Kultivierungsversuche zur Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der CAV1-Expression durch parakrine Mechanismen (Wachstumsfaktoren) in Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) zeigten nach Inkubation mit von PC-3-Zellen (bzw. stromalen Zellen des Tumorbereiches) stammendem konditionierten Medium eine signifikante Reduzierung der endothelialen CAV1-

Expression. Die direkte Gabe von VEGFA resultierte in einer gesteigerten endothelialen CAV1-Expression, was eine Involvierung von CAV1 im Angiogeneseprozess nahe legt.

Des Weiteren wurde keine Aktivitätsbeeinflussung der Metalloproteinasen MMP2 und MMP9 nach erfolgreicher CAV1-Herunterregulierung bzw. -Überexpression anhand transienter Transfektion in vitro gefunden, was eine Involvierung des CAV1 in MMP2- und MMP9-regulierten Prozessen eher ausschließt.

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass epigenetische und angiogenetische Prozesse beim Prostatakarzinom eine bedeutsame Rolle spielen und sowohl für die Diagnostik, Progression und Prognostik wertvolle Informationen liefern können. Besonders die CAV1-mRNA-Expression gibt neue Hinweise auf eine mögliche Bedeutung als Marker, dessen Potenzial zukünftig weiter untersucht werden sollte.

Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatous poliposis coli
AUC	Area under the curve
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BPH	benigne prostatische Hyperplasie
CAV1	Caveolin-1
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
Cq	quantification cycle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EGF	Epidermal Growth Factor
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
GSTP1	Glutathion S-Transferase 1
H/E	Hämatoxylin/Eosin
HGPIN	High-Grade prostatische intraepitheliale Neoplasie
kb	Kilobase(n)
LGPIN	Low-Grade prostatische intraepitheliale Neoplasie
LSAB	Labeled Streptavidin-Biotin
MVD	Mikrogefäßdichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCa	Prostatakarzinom
PITX2	paired-like homeodomain transcription factor 2
RAR β 2	Retinoic acid receptor beta 2
RIN	RNA Integrity Number
ROC	Receiver Operating Characteristic
RT-qPCR	quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
TMA	Tissue-Microarray
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-indolyl-galactopyranosid
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid- Natriumsalz

1 Einleitung

1.1 Die Prostata

Die Prostata – zu Deutsch „Vorsteherdrüse“ – ist ein männliches Drüsenorgan zur Produktion eines dünnflüssigen Prostatasekrets, das bei der Ejakulation in die Harnröhre abgegeben wird und sich mit den Spermien vermischt. Es macht rund 30 % der Spermaflüssigkeit aus und enthält Stoffe, die für die Verflüssigung des Spermas (Proteasen, Phosphatasen), der Spermienmotilität (Spermin) und die Stimulierung des Uterus (Prostataglandine) sowie zur Beeinflussung des Testosteronmetabolismus (Zink) essenziell sind.

Die im Normalzustand kastaniengroße, ca. 20-40 g schwere Prostata lässt sich histologisch in vier Zonen einteilen [1-3], wobei die Gliederung in periphere und Transitionalzone klinisch meist ausreichend ist:

1. zentrale Zone
2. periphere Zone
3. Transitionalzone
4. anteriores fibromuskuläres Stroma (hauptsächlich glatte Muskulatur und Fibroblasten)

Die Prostata besitzt rund 30-50 tubuloalveoläre Drüsen, die in das fibromuskuläre Stroma eingelagert sind [2]. Das Epithel der Drüsen wird von drei verschiedenen Zelltypen aufgebaut, die verschiedene Funktionen bewerkstelligen und teils hormonell reguliert werden. Die Basalzellschicht ist das proliferative Kompartiment des Drüsenepithels, das für die Erneuerung des Epithels zuständig ist. Hier werden auch pluripotente Stammzellen vermutet, die zu Basalzellen ausdifferenzieren und hochmolekulare Zytokeratine exprimieren können. Die Abwesenheit von Basalzellen ist ein wichtiges Indiz für das Vorhandensein eines Karzinoms [4].

Den Hauptanteil der Prostata stellen androgenabhängige sekretorische Epithelzellen dar, die eine niedrige Proliferationsrate besitzen und das Prostata-spezifische Antigen (PSA), die Prostata-spezifische Phosphatase und Androgenrezeptoren exprimieren [5, 6]. Des Weiteren werden nicht-proliferative Zellen in der Prostata gebildet, die endokrin aktive Peptide (Somatostatin, Calcitonin, Bombesin) produzieren. Durch den immunhistologischen Nachweis von Chromogranin und neuronspezifischer Enolase (NSE) kann dieser Zelltyp nachgewiesen werden [7].

Die Vorsteherdrüse ist von einer kapselartigen Bindegewebs- und Muskelschicht umgeben, die häufig jedoch nicht durchgängig ist [8]. In Abb. 1-1 ist die Lage der Prostata im männlichen Urogenitaltrakt schematisch dargestellt.

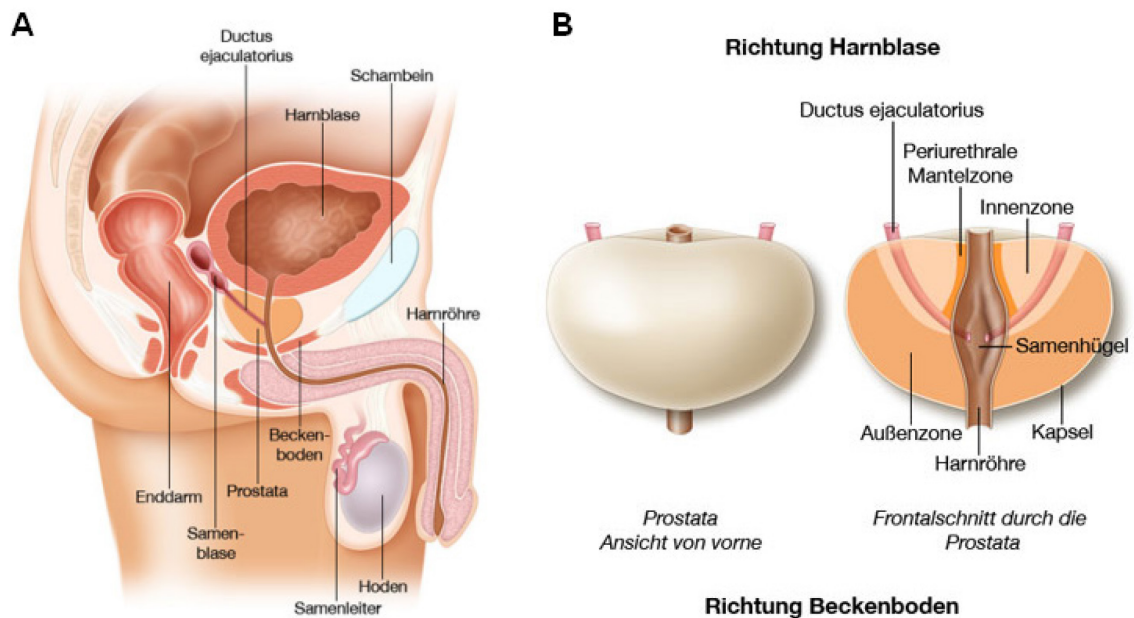


Abb. 1-1: (A) Schematische Darstellung der Lage der Prostata im männlichen Urogenitaltrakt sowie (B) Einteilung der Zonen der Prostata. (Entnommen aus [9])

Unter Einfluss von Androgenen (besonders Testosteron aus Hoden und Dehydroepiandrosteron, gebildet in der Nebennierenrinde) wird die Differenzierung des prostaticen Drüsenepithels reguliert. Um dies zu bewerkstelligen, wird zunächst Testosteron in Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt, das den von sekretorischen Epithelzellen exprimierten Androgenrezeptor aktiviert. Der Androgenrezeptor kann im aktivierten Zustand hormon-responsive Elemente (HRE) im Genom erkennen und dadurch die Expression hormonsensitiver Gene steuern [10, 11]. Er wird nicht von neuroendokrinen Zellen gebildet und nur schwach von Basalzellen exprimiert [5, 6].

Es konnte gezeigt werden, dass für die Prostataentwicklung eine Regulierung des prostaticen Stromas (hauptsächlich bestehend aus Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Nervenzellen sowie infiltrierenden Zellen wie Mastzellen und Lymphozyten) essenziell ist [12, 13]. Die den Androgenrezeptor exprimierenden mesenchymalen Fibroblasten werden dabei durch Androgenstimulierung zur Produktion und Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren, unter anderem VEGF, EGF und FGF, angeregt [14, 15]. Diese können durch

parakrine Wirkungsmechanismen umliegende epitheliale Strukturen in ihrem Wachstum beeinflussen und die Entwicklung der Prostata regulieren.

1.1.1 Erkrankungen der Prostata

Ähnlich wie andere Drüsenorgane kann die Prostata eine Reihe von Erkrankungen und Fehlfunktionen aufweisen, die ihre eigentliche Funktion beeinträchtigen.

Neben der akut oder chronisch auftretenden bakteriellen Infektion (Prostatitis), die zu Entzündungen führen kann und mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen einhergeht, kann es mit fortschreitendem Alter zu einer gutartigen Vergrößerung (benigne Prostatahyperplasie (BPH)) der Prostata kommen [16]. Die BPH entwickelt sich häufig in der Transitionalzone der Prostata und kann zu Störungen der Blasenentleerung führen. Diese altersbedingte gutartige Vergrößerung der Prostata wird in nahezu allen Patienten, die über 80 Jahre alt sind, nachgewiesen und stellt daher eine Volkskrankheit dar. Selten kommt es zur Ausbildung von Prostatazysten oder Prostatasarkomen, die sowohl bei Kindern als auch Erwachsenen vorkommen können.

Als Vorstufe des Prostatakarzinoms wird die prostatiche intraepitheliale Neoplasie (PIN) angesehen, bei der bereits Veränderungen innerhalb des Epithels erkennbar sind, die Basalzellschicht jedoch noch intakt oder fragmentiert ist und keine Invasion auftritt [17]. Eine Unterteilung in Low-Grade (LGPIN) und High-Grade (HGPIN) gibt den Schweregrad der dysplastischen Veränderungen wider. Bei Durchbruch der Basallamina kann sich aus der PIN ein lokal invasiver maligner Tumor entwickeln, der im folgenden Abschnitt näher betrachtet wird.

1.1.1.1 Das Prostatakarzinom

Weltweit stellt das Prostatakarzinom (PCa) heutzutage die zweithäufigste diagnostizierte Tumorerkrankung und die sechsthäufigste Todesursache bei Männern dar [18].

Unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten und die mögliche Metastasierung erfordern individuelle therapeutische Maßnahmen. Bei diesem Tumor häufig auftretende Metastasen zeigen sich vor allem in Lymphknoten und Knochen, was häufig mit Schmerzen in den Knochen verbunden ist und demnach ein Symptom des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms darstellt. Die Inzidenzrate¹ stellt sich beim Prostatakarzinom sehr unterschiedlich dar. Oft werden Tumore erst bei einer Autopsie nach dem Tod festgestellt (Autopsiekarzinome), die den Tod nicht

¹**Inzidenzrate:** Anzahl der Neuerkrankungen (Inzidenz)/Individuenanzahl

verursacht haben. Wesentlich aggressivere Formen des Krebses können die Lebenserwartung jedoch drastisch beeinflussen. Durch eine möglichst frühzeitige Diagnosestellung und durch anschließende individuelle Therapiemaßnahmen lässt sich der Tumor im besten Fall erfolgreich bekämpfen.

1.1.1.1.1 Diagnostik des Prostatakarzinoms

Bei der digital-rektalen Untersuchung (DRU) wird die Prostata durch einen Urologen rektal abgetastet, wodurch eine Aussage über Größe und Beschaffenheit des Drüsenorgans getroffen werden kann. Erscheint die Prostata dabei herdförmig sehr hart, könnte das ein Indiz für ein bestehendes Karzinom sein. Bei dieser Methode kann jedoch nur der periphere, rektumsnahe Bereich untersucht werden, wodurch ein Teil der Karzinome nicht diagnostiziert werden kann. Des Weiteren spielt auch die Erfahrung des Arztes eine Rolle, wodurch die DRU als alleinige Vorsorgeuntersuchung nicht ausreichend ist.

Eine weitere diagnostische Möglichkeit stellt der transrektale Ultraschall (TRUS) dar, bei dem eine Ultraschallsonde transrektal in den Mastdarm eingeführt wird und genaue Bilder von der Prostata und umgebenden Bereichen liefert. Ebenso wie die DRU ist diese Methode jedoch allein zur Früherkennung ungeeignet, da Tumorherde unter 0,5 cm nicht sicher detektiert werden und unspezifische Veränderungen in der Prostata einen Tumor vortäuschen können.

Die erhöhte Konzentration des PSA im Serum ist heutzutage der wichtigste Marker des Prostatakarzinoms [19]. Die Serinprotease der Kallikrein²-Familie, die einen spezifisch von prostaticen Epithelzellen gebildeten Faktor darstellt, wird durch Androgene reguliert [20] und ist für die Verflüssigung des Spermas mitverantwortlich. Da auch bei anderen Krankheitsbildern, wie einer altersabhängigen BPH oder der Prostatitis, ein erhöhter PSA-Serumlevel nachgewiesen werden kann, stellt das PSA keinen tumorspezifischen Marker dar (siehe DGU-Leitlinie [21], sowie Abschnitt 1.1.1.1.4).

Die Durchführung von Stanzbiopsien erfolgt bei Karzinomverdacht aufgrund eines positiven Tastbefundes und/oder erhöhtem PSA-Wert unter Zuhilfenahme des transrektalen Ultraschalls (TRUS) aus festgelegten Bereichen des prostaticen Gewebes. Meist werden mindestens sechs bis acht, oft sogar zehn bis zwölf Gewebeproben aus der peripheren Zone entnommen und durch einen Pathologen histologisch untersucht. Durch das Verfehlen des Karzinomherdes bei der Biopsie können bei dieser Methode allerdings auch falsch-negative

²**Kallikrein:** Serinprotease der Bauchspeicheldrüse und des Blutplasmas, die Kinin aus Kininogenen freisetzt und so eine Blutgefäßweiterung verursacht. PSA=Kallikrein 3 (hK3)

Ergebnisse auftreten, so dass erneute Stanzbiopsie-Untersuchungen bei weiter bestehendem Karzinomverdacht notwendig sind.

1.1.1.1.2 Klassifikation

Anhand des so genannten Gleason-Systems können Prostatakarzinome pathologisch in fünf Grade eingeteilt werden [22]. In den Gewebeproben, die bei Tumorverdacht zur Untersuchung entnommen werden, spielt dabei die Drüsenmorphologie die wesentliche Rolle. Die Summe der Gleason-Grade des größten Tumoranteils (erste Zahl) und des zweitgrößten Tumoranteils (zweite Zahl) ergibt den Gleason Score, der folglich einen Wert zwischen 2 und 10 annehmen kann. Je entdifferenzierter sich der Tumor im histologisch untersuchten Gewebe darstellt, umso aggressiver ist dieser meist. Eine schematische Darstellung der Gleason-Grade mit der dadurch verbundenen Klassifizierung wird in Abb. 1-2 veranschaulicht.

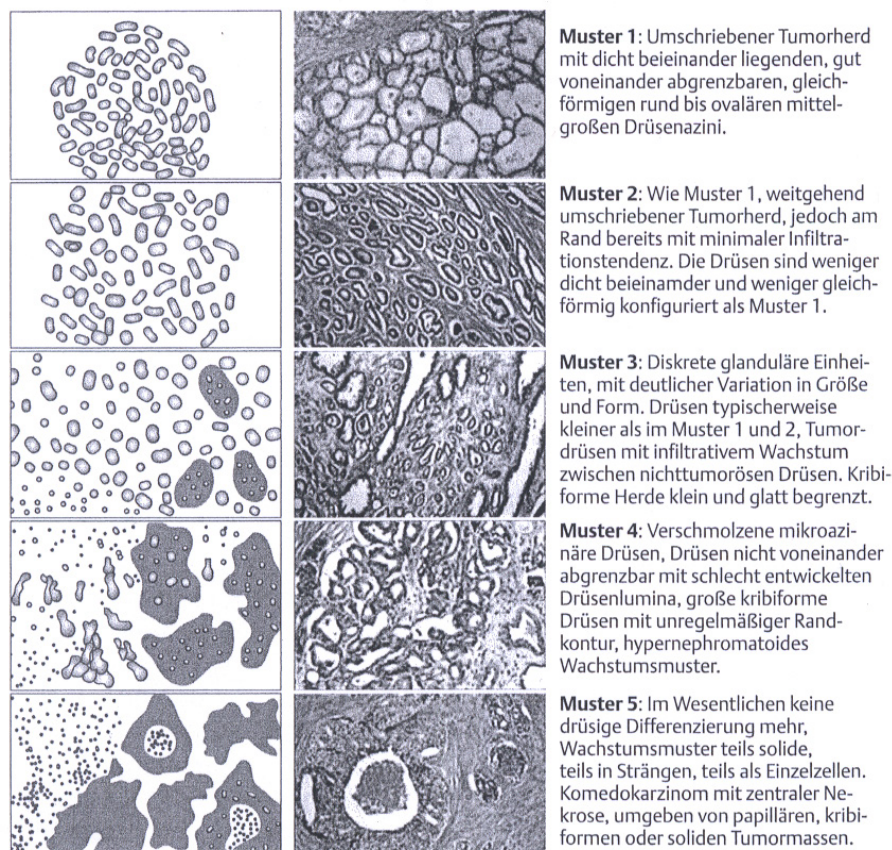


Abb. 1-2: Schematische Darstellung des Gleason-Systems zur Einteilung der Aggressivitätsklassen anhand der Zellmorphologie beim Prostatakarzinom. (Entnommen aus [23])

Tumoren mit einem Gleason Score von 2 bis 4 sind meist in der Transitionalzone der Prostata zu finden und sind klinisch meist uninteressant [24]. Sie werden häufig zufällig zum eigentlichen Karzinom in der peripheren Zone diagnostiziert. Patienten, bei denen Tumoren mit Gleason Scores 5 und 6 identifiziert werden, zeigen ebenso eine sehr gute Prognose. Anders verhält es sich ab Gleason Score 7, bei dem es zu einer Verschlechterung der Prognose kommt, die auch zwischen Gleason 3+4 und Gleason 4+3 Tumoren unterschiedlich verläuft [25]. Eine sehr schlechte Prognose zeigen Tumoren mit Gleason Scores von 8 bis 10 [26]. Diese Tumore sind hochgradig aggressiv und weisen meist schon ein organüberschreitendes Wachstum auf.

Anhand des international geltenden TNM-Systems (Tumor, Node, Metastases) lassen sich weitere Klassifizierungen beim Prostatakarzinom vornehmen [27]. Ein wichtiger Punkt ist dabei die Ausdehnung des Tumors, der sich zum einen nur auf die Prostata beschränken (pT2) oder sich aufgrund eines Kapseldurchbruchs ins umliegende Gewebe ausgebreitet haben kann (pT3). Ebenso bedeutsam ist der Nachweis von möglichen Metastasen in regionären Lymphknoten und/oder anderen Organen bzw. Gewebsstrukturen, die Aufschluss über den Fortschritt der Tumorentwicklung geben (siehe Anhang unter 7.1 für eine ausführliche TNM-Klassifikations-Übersicht).

1.1.1.1.3 Therapeutische Maßnahmen

Kommt es bei der histologischen Untersuchung des Biopsiematerials zu einem positiven Befund, so können nach der DGU-Leitlinie [21] verschiedene Maßnahmen getroffen werden:

1. beobachtendes Abwarten („Watchful Waiting“)
2. aktive Überwachung („Active Surveillance“)
3. radikale Prostatektomie
4. Hormontherapie
5. Strahlentherapie

Das Prinzip des beobachtenden Abwartens („Watchful Waiting“) wird häufig bei Patienten angewandt, die eine Lebenserwartung von unter 10 Jahren besitzen. Erst beim Auftreten von Symptomen wie durch Knochenmetastasen verursachte Schmerzen wird die Erkrankung palliativ und nicht mehr kurativ behandelt.

Häufig führt ein organbegrenzter, gut differenzierter, langsam wachsender Tumor weder zum Tod des Patienten noch schränkt er die Lebensqualität ein. Eine Behandlungsstrategie stellt

daher die aktive Überwachung („Active Surveillance“) bei solchen Karzinomen dar, die dem Patienten zeitlebens wahrscheinlich keine Symptome bescheren werden, jedoch unter Beobachtung stehen. Somit können unnötige Nebenwirkungen, die häufig durch kurative Maßnahmen (radikale Prostatektomie, Bestrahlung) auftreten, bei vermutlich über 60 % der Patienten mit früher Tumordiagnose vermieden werden [28].

Die operative Entfernung der Prostata (radikale Prostatektomie) ist besonders beim lokal begrenzten Tumor die Therapie der Wahl, da hierdurch der Tumor vollständig entfernt werden kann. Gewöhnlich werden bei diesem Eingriff beide Samenblasen sowie die regionalen Lymphknoten entfernt. Werden zudem bei der Operation die neben der Prostata verlaufenden Nervenbündel verletzt oder entnommen, kann es durch das Auftreten von Inkontinenz und/oder Impotenz zu langfristigen Einschränkungen in der Lebensqualität kommen. Nichtsdestotrotz ermöglicht die radikale Entfernung eine genaue Untersuchung des prostatistischen Gewebes und damit eine genaue Klassifizierung des Tumors, wodurch entsprechende adjuvante Therapiemaßnahmen zur besseren Heilung beitragen können.

Die Androgenabhängigkeit prostatistischer Epithelzellen ermöglicht die Durchführung einer Therapie durch Hormonentzug beim lokal fortgeschrittenen oder bereits metastasierten Prostatakarzinom. Der Entzug, der zur Apoptose androgenabhängiger Prostatakarzinomzellen führt [29], kann dabei durch Kastration (irreversibel) oder medikamentös (dauerhaft oder intermittierend) erfolgen, wobei letzteres von der Mehrheit der Patienten bevorzugt wird [30]. Die Unterdrückung der Androgenproduktion kann jedoch zu einem kastrationsresistenten Prostatakarzinom führen, welches durch einen PSA-Anstieg oder Progression der Krankheit trotz antiandrogener Therapie gekennzeichnet ist [31]. Die Gründe hierfür liegen in molekularen Änderungen wie der Überexpression des antiapoptotisch wirkenden Gens Bcl-2 [32] oder des Androgenrezeptors selbst bzw. dessen Aktivitätserhöhung durch spezifische Androgenrezeptor-Kofaktoren [33]. Auch die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden, die androgenunabhängig arbeiten und die Proliferation beeinflussen oder die intrazelluläre Synthese von Testosteron aus Cholesterin kommen für dieses Krankheitsbild in Frage [34].

Die Bestrahlung ist eine weitere Möglichkeit zur Therapie des Prostatakarzinoms, die äußerlich (perkutan) oder innerlich (Brachytherapie) durchgeführt werden kann. Neben dem Primärtumor können so auch Metastasen behandelt werden, was meist zu einer Schmerzlinderung führt. Wie jede Behandlungsmethode birgt auch die Strahlentherapie Risiken wie die Impotenz. Diese tritt bei 40-60 % der Patienten innerhalb von fünf Jahren nach Beginn der Strahlentherapie auf [35].

1.1.1.1.4 Vorhandene Biomarker zur Früherkennung

Obwohl das von Wang und Papsidero [36-38] entdeckte PSA keinen karzinomspezifischen Marker darstellt, gilt die Bestimmung der PSA-Konzentration im Serum seit den 1980er Jahren als die Methode der Wahl zur Abschätzung des Vorhandenseins eines Tumors [19]. Ein erhöhter PSA-Wert kann jedoch ein Fehlintikator sein, da der Faktor auch bei anderen prostaticen Krankheiten, wie der benignen Hyperplasie (BPH) oder der Prostatitis verstärkt gebildet werden kann [16, 39]. Des Weiteren weist ein niedriger PSA-Wert nicht zwangsläufig auf eine tumorfreie Prostata hin. Infolgedessen ist daher eine zu 100 % sichere Diagnosestellung mit diesem Marker allein nicht möglich.

Die PSA-Bestimmung als Vorsorgeuntersuchung wird Männern ab einem Alter von 40 Jahren angeboten, da ein Karzinom bei jüngeren praktisch nicht auftritt. In verschiedenen Langzeitstudien konnte bis dato allerdings kein Überlebensvorteil durch die Vorsorgeuntersuchung ermittelt werden [40-43], so dass der Nutzen eines routinemäßigen PSA-Tests bei gesunden Männern eher fraglich ist. Die in den letzten Jahren deutlich zunehmende Anzahl an Stanzbiopsien sind zudem dem PSA-Screening und dem niedrig gesetzten Cut Off³-Wert für die Beurteilung geschuldet, was wiederum verstärkt zur Detektion von klinisch insignifikanten Tumoren geführt hat [44]. Ob die Bestimmung des PSA als Screening-Methode in vielen Fällen daher sinnvoll ist, wird heutzutage kontrovers diskutiert, da viele Patienten aufgrund des langsam wachsenden Tumors eher an anderen Ursachen sterben als am Krebs selbst.

Die Wahrscheinlichkeit, an einem Prostatakarzinom zu leiden, liegt bei einem im Serum bestimmten PSA-Wert von unter 4 ng/ml bei 10 % und bei einem Wert von 4-10 ng/ml bei 25 %. Wird ein PSA-Wert von über 10 ng/ml detektiert, liegt die Tumorstwahrscheinlichkeit bei 50 % [45]. Dies verdeutlicht die Tatsache, dass ein erhöhter PSA-Gehalt nicht zwangsläufig auf ein Karzinom hinweisen muss. Ab einem Wert von >4 ng/ml wird dem Patienten daher zur weiteren Abklärung die Durchführung der Prostatastanzbiopsie empfohlen. Die Tendenz geht jedoch dahin, bereits bei niedrigeren Grenzwerten (2,5 bzw. 3,0 ng/ml) eine Biopsie durchzuführen.

Viele Wissenschaftler sind auf der Suche nach geeigneten Faktoren, die eine bessere und sichere Vorhersage des Prostatakarzinoms treffen können. Dabei zeigte sich kürzlich das prostate cancer gene 3 (PCA3) in isolierten Prostatazellen aus dem Urin als geeigneter Prostatakarzinommarker, da dessen Transkriptmenge in Prostatakarzinomzellen im Vergleich zu normalen Prostatazellen um das 66-100fache erhöht ist [46, 47]. Bei diesem Test wird ein so

³ Cut Off-Wert: Grenzwert zur Entscheidung, ob Krankheit vorhanden ist oder nicht

genannter PCA3 Score⁴ ermittelt, der das Risiko eines Prostatakarzinomnachweises charakterisiert [48]. Die Wahrscheinlichkeit eines positiven Biopsiebefundes ist dann erhöht, wenn der PCA3 Score einen Grenzwert von 35 überschreitet. Der PCA3-Test wird daher bisher nur als zusätzliche Entscheidungshilfe bezüglich der Durchführung einer Re-Biopsie bei Patienten mit einem PSA-Wert von 2,5-10 ng/ml empfohlen. So können unnötige Biopsien vermieden werden.

Die Suche nach neuen und zuverlässigen Markern zur frühzeitigen Erkennung des Prostatakarzinoms ist daher nötig, um eine noch bessere Diagnosestellung zu gewährleisten und frühzeitig geeignete Therapien für jeden Krebspatienten zu finden.

1.2 Epigenetik in der Tumorentwicklung

Das in Abschnitt 1.1.1.1.4 erläuterte PSA-Dilemma macht deutlich, dass bessere PCa-Marker identifiziert werden müssen, die neben der Verwendung der bislang zur Diagnose und Prognosebestimmung des Prostatakarzinoms verwendeten klinischen und pathologischen Parameter zur Beurteilung herangezogen werden können.

Einen sehr interessanten Ansatzpunkt stellen epigenetische Veränderungen des Genoms dar, die die Genexpression vor allem während der Entwicklung und zellulären Differenzierung regulieren können und auch in der Krebsentstehung und –progression eine wichtige Rolle spielen [49-53]. Hierbei handelt es sich um Modifizierungen, die nicht anhand von Veränderungen in der Primärstruktur der DNA erklärt, sondern aufgrund von Histonmodifizierungen, Cytosin-Methylierung oder durch nicht-codierende RNA verursacht werden [49, 54].

1.2.1 DNA-Methylierung

Die Methylierung ist eine der wichtigsten epigenetischen Veränderungen des Erbguts, die an den Cytosinbasen der DNA auftritt. Die Methylierung erfolgt durch die enzymatische Übertragung einer Methylgruppe des Donors S-Adenosylmethionin (SAM) auf das Kohlenstoffatom in der 5'-Position der Base, wodurch das 5'-Methylcytosin entsteht [55]. Es wurden drei DNA-Methyltransferasen identifiziert, die zum einen für den Erhalt des Methylierungsmusters (DNMT1) in Tochterzellen, zum anderen für die De Novo-Synthese (DNMT3a und DNMT3b) zuständig sind [56, 57]. Findet diese Modifikation in Genbereichen statt, die regulatorisch wirksam sind, wird die Expression dieser Gene beeinflusst. So ist die DNA-Methylierung vor allem in der embryonalen

⁴ **PCA3 Score:** Verhältnis PCA3-mRNA/PSA-mRNA

Entwicklung ein wichtiger Regulator, der essenzielle Funktionen wie die Genexpressionsregulierung, die X-chromosomale Inaktivierung, die Kontrolle der Zelldifferenzierung und –entwicklung, die Chromatinmodifikationen, die Akkumulierung von Mutationen oder die Ausschaltung endogener Retroviren maßgeblich beeinflusst [51, 58-61].

Von besonderer Bedeutung ist die Methylierung so genannter CpG-Dinukleotide (5'-CpG-3', Cytosin-phosphatidyl-Guanin) im Promotorbereich von Tumorsuppressorgenen bzw. tumorrelevanten Genen, was zur starken Beeinflussung der Bindung von Transkriptionsfaktoren und regulatorischen Elementen führt [62]. Im humanen Genom machen CpG-Dinukleotide weniger als 1 % aller Nukleotide aus und sind damit deutlich unterrepräsentiert [63-65]. Siebzig bis 80 % aller CpG-Dinukleotide liegen methyliert vor, vor allem in Bereichen repetitiver Elemente bzw. Regionen mit geringer CpG-Dichte [66]. Im regulierenden Genpromotorbereich der gesunden Zelle treten meist nicht-methylierte CpG-Dinukleotide in rund 400-2000 bp großen Clustern auf, die als CpG-Inseln bezeichnet werden [67].

In den 1990er Jahren wurde erstmals die Hypermethylierung im Promotorbereich des Retinoblastoma (RB1)-Gens, einem Tumorsuppressorgen, entdeckt [68]. Dies führte zu der Annahme, dass diese epigenetische Veränderung hauptsächlich in diesen Genen zu finden ist. Anhand von genomweiten Screening-Techniken weiß man heute jedoch, dass nur ein gewisser Teil der hypermethylierten Gene Tumorsuppressoren darstellen [69].

Eine verstärkte CpG-Methylierung in CpG-Inseln ist eine der häufigsten somatischen Veränderungen bei humanen Tumoren [51]. Diese im frühen Stadium der Tumorentwicklung vorkommende Modifizierung bewirkt das Abschalten der Transkription, da Transkriptionsfaktoren nicht binden können und so sich der nötige Transkriptionskomplex nicht ausbilden kann. Die Bindung methylierungsspezifischer DNA-Bindeproteine der MBD (^{5-m}C-binding domain)-Proteinfamilie können zusätzlich als transkriptionelle Repressoren wirken, die durch Anlagerung an methylierte Sequenzen eine Transkription verhindern [70]. Abb. 1-3 demonstriert vereinfacht die Mechanismen der Genexpressionsregulation durch Promotorhypermethylierung.

Die Hypermethylierung korreliert meist stark mit dem Verlust der Transkriptmenge des untersuchten Locus [49, 71]. Aufgrund der stabilen kovalenten Modifizierung der Cytosine durch Methylierung und der geringen Menge an für die Analyse benötigter DNA stellt die Messung des Methylierungsgrades einen äußerst interessanten Ansatzpunkt in der Tumorforschung dar [66].

Es konnte gezeigt werden, dass eine regionale Hypermethylierung im Promotorbereich mit einer genomübergreifenden Hypomethylierung der Cytosine einhergeht [72]. Diese ist vor allem in nicht-codierenden Genabschnitten sowie repetitiven Elementen zu finden und macht über 40 % des Genoms aus [49, 73]. Diese in frühen Tumorentwicklungsstadien auftretende genomübergreifende Hypomethylierung beeinflusst die genomische Stabilität, bewirkt den

Verlust des Imprintings und kann sowohl zu einem Anschalten der Expression onko-fetaler Gene als auch zur Aktivierung der Transkription repetitiver Elemente führen [49, 74-76]. Eine globale Hypomethylierung wird dabei fast immer in Tumoren beobachtet.

Toyota et al. [77] beschrieben eine Einteilung der CpG-Insel-Methylierung, die sich zum einen krebsspezifisch (Typ C), zum anderen altersabhängig (Typ A) ausbilden kann. Letzteres wurde erstmals beim Östrogenrezeptor (ER)-Gen bei Untersuchung normaler Zellen der Darmmucosa festgestellt, dessen Methylierung mit dem Alter linear zunahm bzw. sehr häufig in Krebszellen vertreten war [78].

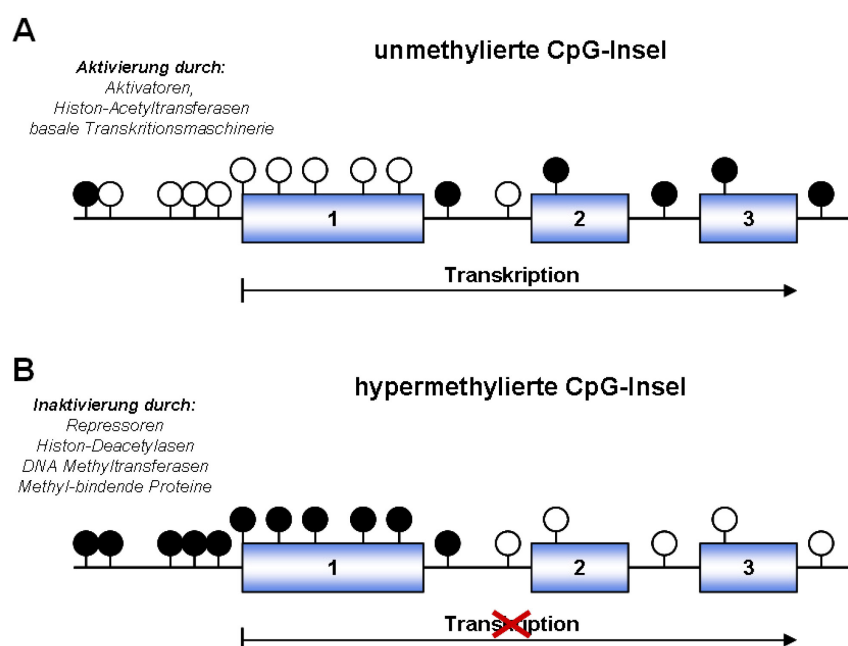


Abb. 1-3: Schematische Darstellung der Expressionsregulation durch CpG-Methylierung unter **(A)** normalen und **(B)** kanzerogenen Bedingungen. Weiße Kreise zeigen den unmethylierten, schwarze Kreise den methylierten Zustand der Cytosine in CpG-Dinukleotiden. (in Anlehnung an [79])

1.2.2 Methylierungsfeldeffekt

Im Jahr 1953 wurde erstmals durch Slaughter et al. [80] der Begriff der „Feld-Kanzerisierung“ bei multifokalen Tumoren des Aerodigestivtraktes beschrieben. Aufgrund des von ihm identifizierten histologisch abnormalen Epithels nahe des Tumors entwickelte er die Hypothese, dass sich Tumoren in verschiedenen Gewebebereichen durch Einfluss bestimmter karzinogener Faktoren simultan entwickeln könnten, wobei viele Zellen gleichzeitig involviert wären. Pathologische und genetische Veränderungen könnten daher bereits im angrenzenden Gewebe nahe des Tumors detektierbar sein [81].

Die Existenz eines epigenetischen Feldeffekts wurde erstmals in der Leber von Kondo et al. [82] beschrieben, als sie veränderte Methylierungsmuster im nicht-kanzerogenen Gewebe von Patienten mit hepatozellulärem Krebs identifizierten. Untersuchungen in anderen Tumorentitäten zeigten ähnliche Resultate. So konnten unter Anderem epigenetische Modifikationen im tumorangrenzenden Normalgewebe bei Tumoren sowohl der Speiseröhre, der Lunge und des Darms als auch von Brust und Niere nachgewiesen werden [83-87].

1.2.3 Interessante Gene zur Bestimmung des Methylierungsfeldeffektes

In den letzten Jahren trat besonders das Glutathion S-Transferase 1 (GSTP1)-Gen in den Fokus der Wissenschaft. Die epigenetische Methylierung im Promotorbereich dieses Gens stellt die wohl am häufigsten vorkommende somatische Veränderung beim Prostatakarzinom dar [88-90]. GSTP1 ist als autosomales Gen auf Chromosom 1q13 zu finden [91, 92]. Das Enzym katalysiert die Konjugation verschiedener hydrophober und elektrophiler Komponenten mit reduziertem Glutathion und spielt daher bei der Detoxifikation schädlicher Substanzen eine essenzielle Rolle [93]. Untersuchungen beim Prostatakarzinom ergaben eine nicht vorhandene Expression des Enzyms in Tumorzellen, wohingegen die GSTP1-Bildung im benignen Gewebe nachgewiesen werden konnte [94]. Eine erhöhte GSTP1-Transkription und die daraus resultierende Erhöhung der enzymatischen Aktivität wird unter Einwirkung karzinogener Substanzen induziert, weshalb dem Enzym eine krebsvorbeugende Wirkung zugesprochen wird [95]. Die reduzierte bzw. nicht vorhandene Expression des GSTP1 im tumorösen Gewebe geht mit einer erhöhten Methylierung im Promotorbereich des Gens einher (96-102). Dies wurde in Tumoren der Niere und Brust gezeigt [96]. Im Prostatakarzinomgewebe konnte in über 90 % der Fälle eine Hypermethylierung des GSTP1-Genpromotors nachgewiesen werden [94, 97, 98].

Neben GSTP1 wurden in vorangegangenen Studien weitere Gene identifiziert, die aufgrund epigenetischer Modifikationen beim Prostatakarzinom „stillgelegt“ sind. Hierzu gehört RAR β 2, ein nukleärer Rezeptor, der durch Bindung von trans-Retinalsäure aktiviert wird und durch Anlagerung an regulatorische Bereiche im Promotor die Transkription von Zielgenen regulieren kann [99]. RAR β 2 ist eine von vier Isoformen (β 1-4), die aufgrund zweier verschiedener Promotoren und alternativen Spleißens gebildet wird und dessen Expressionsmuster sich im embryonalen und adulten Stadium unterscheidet [100, 101]. Aufgrund des Expressionsverlustes in verschiedenen neoplastischen Geweben der Lunge und Brust sowie Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses konnte RAR β 2 als Tumorsuppressor identifiziert werden [102-105]. Dabei spielen epigenetische Modifikationen wie Histonmethylierung und Deacetylierung als Regulatoren der RAR β 2-Expression in Tumorzellen eine Rolle [106-108].

Ein weiteres, durch Methylierung reguliertes Gen ist das auf Chromosom 5q21-q22 liegende APC (Adenomatous poliposis coli) [109-111]. Es verhindert als Tumorsuppressorgen im gesunden Gewebe eine Tumorentwicklung, indem es als Antagonist des Wnt-Signalweges während der frühen embryonalen Entwicklung und anderen physiologischen Prozessen fungiert. Dabei führt die Assoziation des Proteins mit dem APC/Axin/GSK- β -Degradationskomplex zum proteasomalen Abbau des onkogenen Transkriptionsfaktors β -Catenin [112]. Ist APC in der Zelle herunterreguliert, akkumuliert β -Catenin im Zytoplasma und kann durch Wanderung in den Nukleus und Bindung an TCF⁵/LCF⁶-Transkriptionsfaktoren spezifische Wnt-Zielgene wie c-myc und D-Cyclin anschalten [113, 114]. Diese fördern eine Krebsentstehung [115]. Mutationen des APC-Gens treten häufig in Tumoren des Darms auf [116]. Verbreitet findet man veränderte Methylierungszustände bei Tumoren des Aerodigestivtraktes und der Brust [117-120]. Epigenetische Regulierungsmechanismen der APC-Expression spielen auch im Prostatakarzinom eine Rolle. So konnten Bastian et al. [121] Unterschiede in der Methylierung zwischen Normal- und Tumorgewebe bei der Analyse von 53 Patienten finden. Kang et al. [122] wiesen bei Gegenüberstellung von Tumoren mit niedrigeren bzw. hohem Gleason Score höhere Methylierungsraten in letzterer Gruppe nach. Weiterhin wurde die APC-Hypermethylierung kürzlich als Marker einer schlechten Prognose in biopsiertem Gewebematerial identifiziert [123].

Die Hypermethylierung des paired-like homeodomain transcription factor 2 (PITX2)-Genpromotors konnte kürzlich durch Weiss et al. [124] als unabhängiger prognostischer Marker eines biochemischen Rezidivs (hier: PSA-Wiederanstieg) bei PCa-Patienten nach radikaler Prostatektomie identifiziert werden. Der Transkriptionsfaktor findet seine Funktion in der Regulierung der Transkription entwicklungsrelevanter Gene. Seine Expression wird durch den Wnt-Signalweg induziert und vermittelt zelltypspezifische Proliferation durch Aktivierung wachstumsregulierender Gene [125]. Eine Hypermethylierung des PITX2-Gens konnte auch in Patienten mit akuter myeloische Leukämie⁷ gefunden werden und zeigte prognostische Aussagekraft in zwei unabhängigen Brustkrebspatientenkohorten [126, 127].

⁵ TCF: T-cell factor

⁶ LCF: Lymphoid enhancer factor

⁷ **Akute myeloische Leukämie (AML):** bösartige Erkrankung des Blutsystems, bei der es zu krebsartigen Veränderungen von im Knochenmark gebildeten Myeloblasten (Vorläuferzellen der Leukozyten) kommt.

1.2.4 Demethylierung als Therapie

Therapieformen, die speziell auf epigenetische Veränderungen gerichtet sind, werden bereits aktiv untersucht. Die durch Demethylierung herbeigeführte Reexpression von Tumorsuppressorgenen stellt dabei einen interessanten und vielversprechenden Therapieansatz zur Krebsbehandlung dar [128].

Untersuchungen mit verschiedenen Methyltransferase-Inhibitoren, die das Übertragen von Methylresten auf Cytosine verhindern sollen, werden bereits durchgeführt. Spezielle Cytidinanaloge wie 5-Azacytidin, 5-Aza-2-desoxycytidin (Decitabin) oder Zebularin sind als Therapiemöglichkeit daher interessant [129, 130]. Diese Substanzen wirken demethylierend, indem sie bei der Replikation in die DNA eingebaut werden. Die Methyltransferasen, die für die Anknüpfung des Methylrestes zuständig sind, binden kovalent an diese Bereiche und werden in ihrer Funktion irreversibel inhibiert. Dadurch wird eine zusätzliche enzymatische Anheftung von Methylresten verhindert.

Eine weitere Möglichkeit stellen Methyltransferase-Inhibitoren dar, die keine Cytidinanaloge repräsentieren und sich somit nicht in die DNA einlagern. Dazu zählen Procain, Hydralazin, Mitoxantron oder Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), ein Polyphenolbestandteil des grünen Tees. Diese bewirken eine Störung der Enzyminteraktion mit seinem Zielmolekül. Zudem wurde gezeigt, dass EGCG das katalytische Zentrum der humanen DNMT blockieren kann [131]. Diese Nicht-Nukleosid-Analoge konnten jedoch im direkten Vergleich mit dem Nukleosidanaloga wie 5-Aza-2-desoxycytidin nicht überzeugen, da letzteres deutlich effektiver in seiner Funktion der Methylierungsinhibierung und Gen-Reexpression war [132].

Des Weiteren wurden bereits kleine Moleküle entwickelt, die die DNMT inhibieren und damit die Methylierung zum Erliegen bringen sollen. Ein solches Molekül ist das DNMT-herunterregulierende MG98, welches klinisch jedoch bisher keinen beobachtbaren Effekt zeigte [133]. Auch RG108 wirkt inhibitorisch auf DNMT und scheint noch spezifischer für hypermethylierte Tumorsuppressorgene zu sein [134, 135].

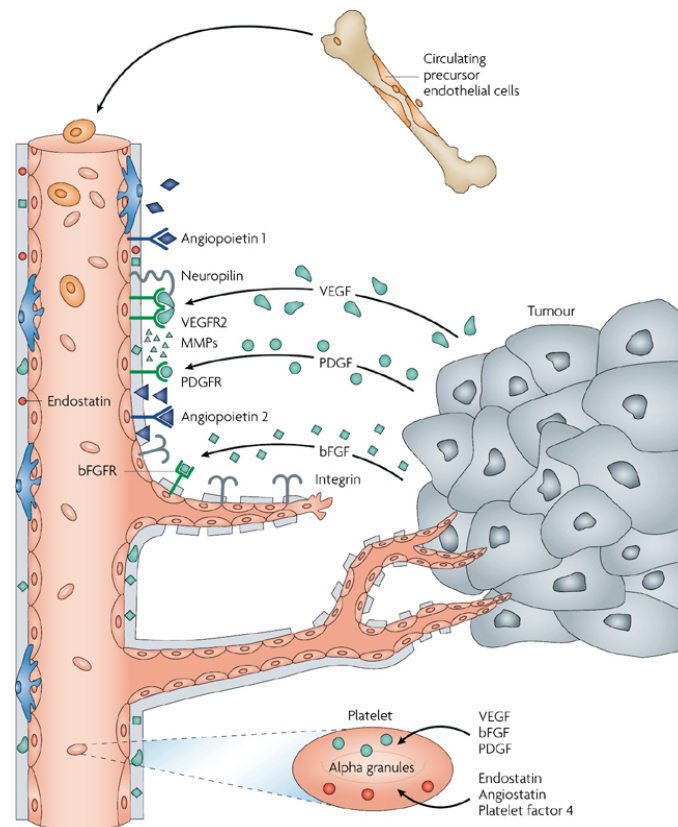
Die Darlegungen zeigen, dass die Methylierung in regulierenden Bereichen des Genoms einen wichtigen Aspekt in der Tumorentwicklung darstellt. Dies birgt sowohl diagnostische als auch prognostische Aussagekraft. Durch ihre Reversibilität bietet sie zudem eine interessante Angriffsfläche neuer Therapiemöglichkeiten, von denen Prostatakarzinompatienten zukünftig profitieren könnten.

1.3 Die Mikrogefäßdichte beim Prostatakarzinom

Angiogenetische Prozesse spielen bei der Entwicklung eines Karzinoms eine wesentliche Rolle. So entdeckten Gimbrone und Kollegen im Jahre 1972 erstmals, dass solide Tumoren ihre eigene Blutversorgung induzieren können [136]. Die Bildung neuer Blutgefäße aus dem bestehenden Blutgefäßsystem stellt eine entscheidende Maßnahme zur Entwicklung und Progression eines Tumors dar, da sich dieser ab einer bestimmten Größe an das bestehende Blutgefäßsystem anlagern muss, um sein Wachstum zu gewährleisten. Während der Angiogenese gebildete Gefäße unterscheiden sich von reifen Gefäßen hinsichtlich ihrer Morphologie und Funktion. So sind sie strukturell wenig organisiert und die endothelialen Zellen und Perizyten⁸ morphologisch verändert. Auch lässt sich ein differentes Oberflächenmarkerprofil und andere Adhäsionsmoleküle beim Vergleich mit ausgebildeten Gefäßen erkennen. Der Prozess der Angiogenese ist in Abb. 1-4 schematisch dargestellt und wird anhand des Schemas erklärt.

Anfang der 1990er Jahre wiesen Weidner et al. [137-139] das prognostische Potenzial der Mikrogefäßanzahl in Geweberegionen mit hoher Gefäßkonzentration (so genannte „Hot Spots“) bei Brust- und Prostatakrebs nach. Verschiedene Arbeiten zur Prostatakarzinom-Thematik zeigten zudem signifikante Korrelationen der Mikrogefäßdichte mit pathologischen Parametern wie Gleason Score, pT-Stadium und dem Patientenüberleben [140-142]. Eine andere Studie von Silberman et al. [143] zeigte jedoch, dass die MVD zwar mit der Progression nach radikaler Prostatektomie, jedoch nicht mit dem pathologischen Stadium bei PCa-Patienten mit Gleason Scores 5-7 korreliert. Auch Rubin et al. [144] konnten keinen Zusammenhang zwischen der MVD und pathologischen Faktoren finden, als sie Gewebematerial von 87 Patienten analysierten. Kürzlich veröffentlichte Resultate zur computergesteuerten Auswertung von 2-dimensionalen PCa-Gewebeschnitten zeigten beim Vergleich von Patienten mit höherer und Patienten mit geringerer tumoraler Gefäßdichte (im Vergleich zum umgebenden Normalgewebe) signifikante Unterschiede unter anderem im Serum-PSA-Level und Tumolvolumen [145]. Keine Unterschiede bestanden in Abhängigkeit von pathologischem Stadium oder Gleason Score. Die Bedeutung der Mikrogefäßdichte beim Prostatakarzinom ist daher ein kontrovers diskutiertes Thema und bedarf weiterer Untersuchungen, die den Stellenwert des Faktors in dieser Tumorentität präzisieren.

⁸ **Perizyten:** gefäßumspannende Bindegewebszellen



Nature Reviews | Drug Discovery

Abb. 1-4: Angiogenese in der Tumorentwicklung. Der von Tumorzellen sezernierte Wachstumsfaktor VEGF bindet an den auf Endothelzellen vorhandenen VEGFR2-Rezeptor und Neuropilin, wodurch über eine Signalkaskade die Expression verschiedener relevanter Gene reguliert wird. Die von einigen Tumoren sezernierten Faktoren bFGF und PDGF können ebenfalls durch Bindung an ihre jeweiligen Rezeptoren eine veränderte Expression relevanter Gene auslösen. Die von Tumorzellen und VEGF-stimulierten Endothelzellen sezernierten Matrixmetalloproteinasen (MMPs) können Komponenten der extrazellulären Matrix degradieren, wodurch die Invasion und Migration neuer Zellen vereinfacht wird. Des Weiteren wird Angiopoietin-2 von Tumorzellen sezerniert, welches an den endothelialen TIE2-Rezeptor binden kann und die Degradierung der Gefäßmembran sowie die endotheliale Migration erhöht. Integrine vermitteln die Bindung endothelialer Zellen an extrazelluläre Membranen. Sie werden durch bestimmte pro-angiogenetische Proteine hochreguliert, die die Sensitivität auf mitogene (VEGF, bFGF) und anti-mitogene Wachstumsfaktoren (Endostatin) erhöhen. Einige pro- und antiangiogenetische Proteine werden in α -Granules gespeichert und ins Tumorgefäßsystem freigesetzt. (Entnommen aus [146])

1.3.1 Endotheliale Faktoren

1.3.1.1 CD-Moleküle der endothelialen Oberfläche

Blutgefäße sind mit einer einschichtigen Zellschicht, den Endothelzellen, ausgekleidet. Dieser Zelltyp zeigt in seinem Aufbau eine zu anderen Zelltypen differenzielle Oberflächenstruktur, die charakteristisch für Endothelzellen ist. Sie ist geprägt durch in die Plasmamembran verankerte Cluster of Differentiation (CD)-Oberflächenmoleküle, die in die extrazelluläre Matrix hineinragen und mit dort befindlichen Molekülen interagieren können.

Das Oberflächenmolekül CD31 (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule, PECAM-1) ist ein endothelialer Faktor, der auch auf Makrophagen oder Plättchen zu finden ist [147]. CD34 ist zusätzlich auf der Oberfläche von hematopoietischen Stammzellen nachweisbar und wird daher als Stammzellmarker zur Detektion kleiner, sich neu entwickelnder Blutgefäße genutzt [148]. Vergleichende Studien, bei denen die CD34-Expression von gesundem und tumorösem Prostatagewebe gegenübergestellt wurde, konnten eine deutlich erhöhte Anzahl CD34-exprimierender Kapillaren im Prostatakarzinom nachweisen [149-151].

Das Transmembranmolekül Endoglin (CD105), welches als Rezeptor des Transforming Growth Factor (TGF) β 1 und -3 fungiert, ist bei der Zellproliferation beteiligt [152]. Des Weiteren werden das Adhäsionsmolekül CD144 (Vascular Endothelial Cadherin, VE-cadherin), ein Vertreter der Cadherin-Familie, bzw. CD146 (Melanoma Adhesion Molecule) von Endothelzellen exprimiert [153]. Bardin et al. [154] bzw. Sers et al. [155] konnten für letzteren Faktor eine Assoziation mit der Tumorprogression und Metastasierung in malignen Melanomen nachweisen.

1.3.1.2 VEGFA und VEGFR2: wichtige Faktoren der Angiogenese

Der vaskuläre endotheliale Faktor A (VEGFA) ist ein wichtiger Faktor zur Regulierung der tumoralen Angiogenese und der Neuentstehung von Blutgefäßen während der embryonalen Entwicklung (Vaskulogenese) aus Angioblasten [156]. Dieser Faktor kann an zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren (VEGFR1 und VEGFR2) binden und diese aktivieren [157]. VEGFR2 (oder KDR, Flk-1) bewirkt bei Aktivierung durch VEGFA die Anschaltung von Signaltransduktionswegen, die die Proliferation und Migration endothelialer Zellen regulieren [158]. VEGFR2 wurde als frühester Marker in der Endothelzellentwicklung erkannt [159].

Diese wichtigen Regulatoren der tumoralen Angiogenese sind bereits in den Fokus der Therapieforschung gelangt, da sie einen Angriffspunkt verschiedener Angiogeneseinhibitoren bieten können [160].

1.3.1.3 Caveolin-1 (CAV1)

Das 22-24 kDa umfassende Integralmembranprotein CAV1 ist ein Strukturprotein so genannter Caveolae (Abb. 1-5), die kleine Plasmamembraneinstülpungen mit einem Ausmaß von 60-80 nm repräsentieren und einen hohen Anteil an Cholesterol und Phosphosphingolipiden besitzen [161]. CAV1 spielt eine Rolle in zellulären Prozessen wie Signaltransduktion, Cholesterintransport und Endocytose [162]. CAV1 ist in den meisten Zelltypen nachweisbar und in Endothelzellen,

Fibroblasten und Adipozyten angereichert [161]. Neben CAV1 existieren zusätzlich zwei weitere Isoformen, die zum einen häufig mit CAV1 ko-exprimieren und Heterooligomere bilden können (CAV2, [163, 164]), zum anderen ausschließlich gewebespezifisch in skelettalen und glatten Muskelzellen auftreten (CAV3, [165, 166]). In den jeweiligen Zelltypen führt die Unterdrückung der CAV1- bzw. CAV3-Expression zum Caveolae-Verlust und bewirkt grundlegende zelluläre Veränderungen im Organismus [167, 168].

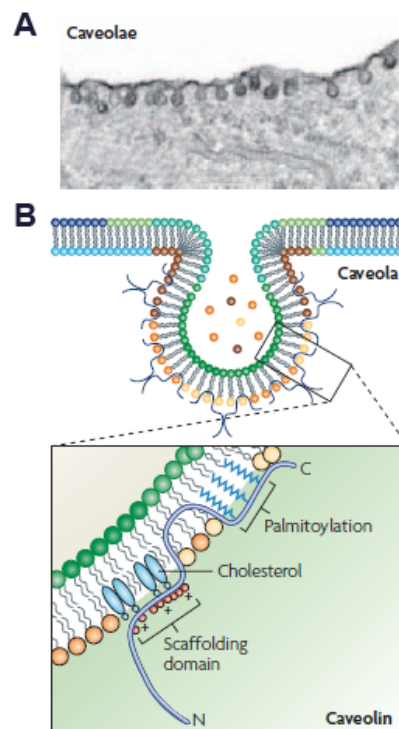


Abb. 1-5: Struktur von Caveolae und dem Integralmembranprotein CAV1. **(A)** Elektronenmikroskopische Aufnahme von Caveolae in der Plasmamembran von Adipozyten. **(B)** Schematische Struktur einer Caveole sowie die monomere Struktur des CAV1-Proteins. Der N- und C-Terminus liegt auf der zytosolischen Seite der Zellmembran. Die hoch konservierte scaffolding Domain-Region kann mit Signalmolekülen agieren und spielt eine mögliche Rolle bei der Cholesterininteraktion durch basische und hydrophobe Reste (rote Kreise). Palmitoylgruppen sind am C-Terminus zu finden. (Modifiziert nach [161])

Das CAV1-Protein kann in zwei Formen auftreten, die sich in der Anzahl ihrer Aminosäuren unterscheiden. Die α -Form des Proteins ist mit insgesamt 178 Aminosäuren um 31 Aminosäuren länger als seine β -Form (147 Aminosäuren) [169]. CAV1 besitzt eine so genannte CAV1 scaffolding domain (CSD), durch die es mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten kann [170]. Eine Reihe von Signalmolekülen konnten bereits identifiziert werden, die ein Bindemotiv für die CSD aufweisen und funktionell durch die CAV1-Interaktion beeinflusst werden. So wurden unter anderem Ko-Lokalisationen mit der Fettsäuresynthase (FSN), Phosphatasen, der endothelialen

NO-Synthase, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Rezeptor-Thyrosinkinasen gezeigt [170-173].

Bei Untersuchungen mit der metastatischen Prostatakarzinomzelllinie PC-3 konnte CAV1 in sezernierten Prostatasomen⁹ gefunden werden [174]. Dies führte zu der Annahme, dass CAV1 von prostatistischen Tumorzellen in das umliegende Gewebe bzw. in die Prostataflüssigkeit sezerniert werden kann. Thompson et al. [175] wiesen zudem eine Resorption durch Tumorzellen bzw. die Aufnahme durch tumorassoziierte Endothelzellen aufgrund autokriner bzw. parakriner Mechanismen nach, wodurch CAV1 zur Modulierung von Angiogenese, Tumorprogression und Metastasierung beitragen kann.

Yang et al. [173] konnten im prostatistischen Gewebe eine mögliche CAV1-Involvierung in angiogenetischen Prozessen aufgrund der Korrelation von Mikrogefäßdichte und tumoraler CAV1-Expression zeigen. Zusätzlich wiesen sie in tumorassoziierten Endothelzellen anhand doppelter Immunfluoreszenz eine Ko-Lokalisierung des Proteins mit VEGFR2 nach. Auch im klarzelligen Nierenzellkarzinom korrelierte die CAV1-Expression mit der MVD und zeigte eine schlechtere Prognose bei Patienten mit höherer Proteinexpression [176].

Engelman et al. [177] konnten bei ihren Analysen zur Genstrukturaufklärung neben CAV2 eine detaillierte Darstellung des CAV1-Gens geben, das in der umgebenden Region des D7S522 Locus, ein bei Krebserkrankungen häufig von Deletionen betroffener Bereich, zu finden ist. Der Promotorbereich sowie die Exone 1 und 2 sind in CpG-Inseln lokalisiert [178].

⁹ **Prostatasomen:** mit Lipid Raft-Komponenten angereicherte vesikuläre Organellen

1.4 Fragestellung

Das Prostatakarzinom ist der häufigste Tumor des Mannes in den wirtschaftlich entwickelten Ländern [18]. Eine frühzeitige Erkennung ist jedoch aufgrund fehlender, gut funktionierender Biomarker nicht immer realisierbar, oder der Tumor wird erst in späten Stadien entdeckt. Dieser Umstand macht die Suche nach neuen Markern zur Diagnostik, Prognose und Prädiktion zur Abschätzung von weiteren Therapiestrategien notwendig.

In dieser Dissertation sollte zunächst die Gen-Promotormethylierung als epigenetischer Genexpressionsregulationsmechanismus hinsichtlich einer möglichen Einsetzbarkeit als diagnostisches Werkzeug untersucht werden. Dabei standen folgende Punkte im Vordergrund:

1. Untersuchung eines möglichen Methylierungsfeldeffektes in der Prostata anhand der Bestimmung der Hypermethylierung in den Promotorbereichen der Gene GSTP1, RAR β 2, APC und PITX2 im Tumor- und tumorangrenzenden Normalgewebe
2. Bestimmung des Zusammenhangs von Hypermethylierung und Progression des Tumors
3. Durchführung eines Profilings zur Identifizierung weiterer, durch Hypermethylierung regulierter Gene mittels des MethylProfiler-Systems

Ein weiterer zu untersuchender Aspekt der vorliegenden Dissertation stellte die Rolle der Angiogenese beim Prostatakarzinom dar, die in verschiedenen Tumorentitäten als wichtiger Progressionsmarker fungiert. Folgende Schwerpunkte wurden dabei behandelt:

- a. Bestimmung der Angiogenese anhand von Genexpressionsanalysen endothelialer und angiogenetischer Faktoren (CD31, CD34, CD105, CD144, CD146, VEGFR2, VEGFA, CAV1) in einem ausgewählten Patientenkollektiv
- b. Bestimmung der Mikrogefäßdichte anhand des immunhistochemischen Nachweises endothelialer Faktoren im Tissue-Mikroarray-Format
- c. Bestimmung möglicher Assoziationen von immunhistochemisch bestimmter Mikrogefäßdichte und endothelialer Genexpression
- d. Ermittlung möglicher Unterschiede in der Expression endothelialer Marker zwischen Tumor- und tumorangrenzenden Normalgewebe der Prostata
- e. weiterführende Untersuchungen zum CAV1 mit nachgewiesener differenzieller Genexpression zwischen Tumor- und tumorangrenzenden Normalgewebe mit Schwerpunkt auf epigenetischer Regulation

- f. Korrelation der immunhistologischen und molekularen Befunde mit konventionellen pathologischen Prognoseparametern

Zusammengefasst sollen die Untersuchungen von epi- und angiogenetischen Faktoren zur Identifizierung neuer Marker für Diagnose, Progression und Prognose des Prostatakarzinoms beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendetes Gewebe

Die Untersuchungen an humanem Gewebematerial erfolgte nach den ethischen Richtlinien der Charité Berlin. Ein Großteil der Untersuchungen erfolgte an gefrorenem Frischgewebematerial, dass unmittelbar nach der durchgeführten Operation vom Pathologen verifiziert und in flüssigem Stickstoff eingelagert wurde. Ein weiterer Teil der Experimente erfolgte an archivierten, Paraffin-eingebetteten Gewebelöcken, von denen Schnitte angefertigt bzw. Gewebstanzen zur weiteren Analyse entnommen wurden.

2.1.2 Verwendete Oligonukleotide

Alle in dieser Dissertation verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang unter Punkt 7.2 detailliert aufgelistet.

2.1.3 Verwendete Antikörper

Name	Firma	mono/polyklonal	Verdünnung
CD31 (Clone JC70A)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	monoklonal, anti-Maus	1:50
CD34 (Clone QBEnd-10)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	monoklonal, anti-Maus	1:100
VEGF	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA	polyklonal, anti-Kaninchen	1:50
CAV1 (N-20)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, USA	polyklonal, anti-Kaninchen	1:500
β-Aktin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	monoklonal, anti-Maus	1:2500
Sekundärantikörper, HRP-konjugiert	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	monoklonal Kaninchen, anti-Maus	1:2500
Sekundärantikörper, HRP-konjugiert	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	polyklonal Ziege, anti-Kaninchen	1:2500

2.1.4 Verwendete Vektoren und Bakterienstämme

Vektor	Firma
pCR 2.1-TOPO	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
pCR Blunt II-TOPO	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
pGL3-Basic	Promega, Mannheim, Deutschland
pGL3-Promoter	Promega, Mannheim, Deutschland
pRL-TK	Promega, Mannheim, Deutschland
pcDNA3.1(-)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Bakterienstamm	
dam ⁻ /dcn ⁻ E.coli, chemisch kompetent	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
OneShot Top10 E.coli, chemisch kompetent	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

Zugehörige Vektorkarten sind im Anhang unter Punkt 7.3 zu finden.

2.1.5 Substanzen/Chemikalien/Verbrauchsmaterialien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Substanzen von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen.

Substanz	Firma
96-Well-Platten (weiß, flacher Boden)	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Well-RT-qPCR Platten (weiß)	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
Accutase	PAA, Pasching, Österreich
Acrylamid/Bis-Lösung (40%w/v)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Agarose-1000	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Aquatex	Merck KgH, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	MP Biomedicals, Solo, OH, USA
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching, Österreich
Endothelial Cell Growth Media 2	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Endothelial Cell Growth Media I	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Eosin-Lösung	Waldeck GmbH und Co. Kg., Münster, Deutschland
FCS	PAA, Pasching, Österreich
Fetal Bovine Serum Gold	PAA, Pasching, Österreich
Formaldehyd-Lösung (4%)	Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Glycerin	Merck KgH, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun-Lösung sauer nach Mayer	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, Deutschland
Human basic Fibroblast Growth Factor	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Human Epidermal Growth Factor	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Human Vascular Endothelial Growth Factor-165	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Immobilon-PSQ transfer membranes (0.45 µm)	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
OptiMem	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Pertex	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
RPMI 1640	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
SOC-Medium	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Transferrin	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
Trypsin/EDTA (10x)	PAA, Pasching, Österreich
Zellkulturflaschen (T25, T75; Falcon bzw. Primaria)	BD Biosystems, Heidelberg, Deutschland
Zellkultur-Multiwellplatten (6x, 24x, 96x)	BD Biosystems, Heidelberg, Deutschland

2.1.6 Verwendete Kits

Kit	Firma
AmpliTaQ Gold 360 Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Bisulfite DNA Quantification Standards	Epigenomics, Berlin, Deutschland
BstUI, EcoRI, KpnI	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Cell Proliferation Kit (XTT)	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
DAKO Real Detection System Alkaline Phosphatase/RED Rabbit/Mouse	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
dam-/dcm- Competent E. coli	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
DNA Molecular Weight Marker VIII	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
DNA Molecular Weight Marker X	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
DNA Molecular Weight Marker XIV	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim, Deutschland
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
EpiTect MethyLight Assay: Hs_PITX2	Qiagen, Hilden, Deutschland

EpiTect MethyLight PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
EpiTect PCR Control DNA Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
FuGENE HD Transfection Reagent	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker	GE Healthcare, München, Deutschland
Gel Loading Buffer	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
LightCycler 480 Probes Master	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
LightCycler FastStart DNA Master HybProbe	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
LightMix Kit GSTP1	Epigenomics, Berlin, Deutschland
LightMix Kit Reference G	Epigenomics, Berlin, Deutschland
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Methyl-Profiler DNA Methylation Enzyme Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Methyl-Profiler DNA Methylation PCR Array System	Qiagen, Hilden, Deutschland
Methyltransferase M. SssI	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
OneShot TOP10 Chemically Competent E. coli	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Pfx Taq Polymerase	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Platinum PCR SuperMix HighFidelity	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Protein Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
Protein Standard (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Reverse Transkriptase Kit	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT ² SYBR Green qPCR Master Mix	Qiagen, Hilden, Deutschland
Sigma Fast Red TR/Naphthol AF/ TX Tablets	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
siPORT NeoFX Transfection Reagent	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TOPO TA Cloning	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
Universal ProbeLibrary Probes	Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland
Validated Silencer Select siRNA (CAV1)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.1.7 Geräte

Geräte	Firma
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies GmbH, Böblingen, Deutschland
Antares 48 Laminar Flow Box	Cotech Vertrieb GmbH, Berlin, Deutschland
Anthos htIII	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland
Biometra Agel Mini	Biometra, Göttingen, Deutschland
Biometra PowerSupply	Biometra, Göttingen, Deutschland
ECOM 6122 (Photometer zur Proteinkonzbest.)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fluor-S Multimager	Bio-Rad, München, Deutschland
Gel-Kassetten	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Leica DM2000 (Mikroskop)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica EG 1150C (Kühltisch)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica HI 1210 (Wasserbad)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica RM2125RT (Mikrotom)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leitz Fluovort Mikroskop	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
LKB BROMMA 2301 Marodrive 1 Power Supply	LKB, Bromma, Schweden
MiniSpin centrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mithras LB940	Berthold GmbH, Bad Wildbad, Deutschland
NanoDrop ND-1000	NanoDrop, Wilmington, DE, USA
Nikon CoolPix ID700J	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Rotanta 460 RS	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Schüttel-Inkubator	Biometra, Göttingen, Deutschland
Superfrost Plus Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
X Cell SURELock	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

In vitro-Untersuchungen zur funktionellen Analyse verschiedener Aspekte wurden anhand von Zellkulturexperimenten mit den in Tab. 2-1 aufgeführten Zelllinien durchgeführt.

Tab. 2-1: Übersicht der in dieser Dissertation verwendeten humanen Zelllinien

Zelllinie	
LNCaP	Prostatakarzinomzelllinie, isoliert aus Metastasen des supraclavicularen Lymphknotens eines 50-jährigen Mannes mit PCa aus dem Jahr 1970, adhärent, fibroblastoide Zellen, androgensensitiv
PC-3	Prostatakarzinomzelllinie, isoliert aus Metastasen des Knochenmarks, isoliert nach dem Tod eines 62-jährigen Mannes mit Grad 4-PCa nach Androgen-Suppression-Therapie, epitheliale Zellen, adhärent, androgeninsensitiv
DU-145	Prostatakarzinomzelllinie, isoliert aus metastatischem Tumorgewebe des Zentralnervensystems eines 69-jährigen Mannes mit PCa aus dem Jahr 1975, epitheliale, adhärente Zellen
BPH-1	prostatistische Epithelzellen eines 68-jährigen Mannes mit benigner Hyperplasie (BPH), immortalisiert mittels SV-40 large T-Antigen, adhärente epitheloide Zellen
HUVEC	Endothelzellen der Nabelschnurvene
primäre stromale Zellen	Fibroblasten, isoliert aus unterschiedlichen Bereichen der Prostata (aus normal und/oder kanzerogenen Arealen)

Die Zelllinien LNCaP, PC-3, DU-145 sowie BPH-1 wurden von der ATCC (American Type Culture Collection) bzw. der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. HUVEC-Zellen wurden von PromoCell angefordert. Die Isolation stromaler Primärzellen aus Frischgewebe erfolgte im eigenen Labor (siehe 2.2.1.2).

2.2.1.1 Kultivierungsbedingungen humaner Zelllinien

Die verwendeten Prostatakarzinomzelllinien wurden generell im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in Zellkultivierungsflaschen in serumhaltigem (10 % FCS) RPMI 1640-Medium unter Zugabe von Penicillin/Streptomycin (1x) kultiviert. Die Kultivierung der BPH-1-Zelllinie erfolgte in RPMI 1640-Medium mit 20 % FCS, 20 ng/ml DHT, 5 µg/ml Transferrin, 5 ng/µl Natriumselenit und 5 ng/µl Insulin. Die Endothelzelllinie HUVEC wurde unter gleichen Bedingungen kultiviert, jedoch erfolgte das Wachstum in speziell für Endothelzellen abgestimmtem EGM-Medium (PromoCell).

Zur Langzeitaufbewahrung wurden Stocks der jeweiligen Zelllinien angelegt, indem das Zellpellet in Medium mit 10 % Serum (v/v) unter Zugabe von 10 % DMSO (v/v) aufgenommen und in Kryoröhrchen portioniert wurde. HUVEC-Zellen wurden in herkömmlichem EGM-Medium kryokonserviert. Nach 12-stündiger Vorlagerung bei -80 °C wurden die Zellen zur Langzeitaufbewahrung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.1.2 Isolation stromaler Zellen aus prostatichem Primärgewebe

Die Isolierung von primären Stromazellen aus prostatichem Gewebe erfolgte nach der beschriebenen Methode von Janssen et al. [180]. Unter sterilen Bedingungen wurden hierbei die ca. 1 mm³ Gewebestückchen zerkleinert und enzymatisch mit 0,25 % Kollagenase Typ III in RPMI 1640-Medium (mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µU/ml Streptomycin und 2,5 µU/ml Amphotericin) bei 37 °C für 15 min schüttelnd im Wasserbad verdaut. Nach der Zentrifugation (5 min, 1220 U/min) wurde das Gewebepellet mit PBS gewaschen und zweimal in 0,05 % Trypsin mit 0,02 % EDTA bei 37 °C für 5 min bzw. 10 min inkubiert. Die gewonnenen Gewebestücke wurden in RPMI 1640-Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt. Der Nachweis von Stromazellen erfolgte immunhistologisch anhand der Stromazellmarker Vimentin und glattmuskulärem Aktin (SMA). Zellen bis maximal zur zehnten Passage wurden für die Untersuchungen verwendet.

2.2.1.3 Bestimmung der Proliferation mittels XTT

Zur Ermittlung der Zytotoxizitätswirkung der verwendeten Substanzen 5-Aza-2-desoxycytidin, Trichostatin A, VEGFA, bFGF und EGF auf die Zellproliferation wurde der XTT Proliferation II Assay (Roche) anhand der Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine nicht-radioaktive, kolorimetrische Methode, bei der das gelbe Tetrazoliumsalz XTT von lebenden Zellen verstoffwechselt und in einen orange-farbenen Formazan-Farbstoff umgesetzt wird. Dieser kann bei einer Wellenlänge von 450-500 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm photometrisch gemessen werden.

2.2.1.4 Inkubation der LNCaP-Zelllinie mit 5-Aza-2-desoxycytidin

Für DNA-Demethylierungsexperimente wurde die CAV1-defiziente LNCaP-Zelllinie verwendet, um ein mögliches Anschalten der Expression durch Inkubation mit dem Cytidin-Analogon 5-Aza-2-desoxycytidin zu untersuchen. Die Zellen wurden 24 h vor Inkubationsbeginn dünn ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit 5-Aza-2-desoxycytidin in verschiedenen Konzentrationen (0, 5, 10, 25, 50, 100 µM). Ein Mediumwechsel mit entsprechender Substanzkonzentration erfolgte alle 48 h. Die Inkubationsdauer betrug 168 h. Danach erfolgte die RNA-Isolation mit anschließender CAV1-Quantifizierung mittels der RT-qPCR.

2.2.1.5 Inkubation der LNCaP-Zelllinie mit Trichostatin A (TSA)

Der inhibitorische Effekt auf Deacetyltransferasen wurde anhand der Trichostatin A-Behandlung von LNCaP-Zellen untersucht. Hierbei wurden TSA-Konzentrationen von 0 – 100 nM verwendet. Die Zellen wurden zunächst dünn ausgesät. 24 h später erfolgte die TSA-Behandlung mit den jeweiligen Konzentrationen analog der Behandlung mit 5-Aza-2-desoxycytidin. Um einen möglichen synergistischen Effekt auf DNA-Methylierung und -Acetylierung zu untersuchen, wurden zudem bereits mit 5-Aza-2-desoxycytidin behandelte Zellen zusätzlich nach 48-stündiger Inkubation mit TSA behandelt. Nach einer Inkubationsdauer von 48 h erfolgte die RNA-Isolierung mit anschließender Quantifizierung mittels der RT-qPCR.

2.2.1.6 Behandlung von HUVEC mit Wachstumsfaktoren

Zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Wachstumsfaktoren auf die CAV1-Expression in HUVEC-Zellen wurden diese zunächst in Komplet-Medium (EGM2 + Supplement) in 6-Well-Platten ausgesät. Nach einer Inkubationsdauer von 24 h und einer Konfluenz von 60 % erfolgte ein Mediumwechsel mit serumfreiem Medium ohne Zusätze. Weitere 24 h später wurden die jeweiligen Wachstumsfaktoren in einer Konzentration von 5 ng/ml zu den Zellen gegeben und für weitere 48 h inkubiert. Danach erfolgte die Proteinisolierung mittels Ripa-Puffer (siehe Anhang, Tab. 7-7) und die anschließende Analyse anhand des Western Blots.

2.2.1.7 Ko-Kultivierung von HUVEC mit konditionierten Zellkulturüberständen

Um den Einfluss parakriner Faktoren, erzeugt von unterschiedlichen Zelltypen, auf die CAV1-Expression von CAV1 in HUVEC-Zellen zu untersuchen, wurden Ko-Kultivierungsexperimente durchgeführt.

Zur Ermittlung der endothelialen CAV1-Expression nach Behandlung mit konditioniertem Medium der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 wurden zur Konditionierung sowohl HUVEC- als auch PC-3-Zellen in 6-Well-Platten in EGM1-Komplettmedium dünn ausgesät. Nach 48 h wurde der PC-3-Zell-Überstand zu unterschiedlichen Teilen (bzw. 1:1) mit frischem EGM1-Komplettmedium versetzt und auf die HUVEC-Zellen gegeben. Weitere 48 h später erfolgte die Ernte der HUVEC-Zellen zur Proteinisolierung mit anschließender Western Blot-Analyse.

Diese experimentelle Vorgehensweise wurde zudem sowohl mit konditionierten Zellüberständen von BPH-1-Zellen (Kontrolle), als auch mit isolierten Stromazellen aus Normal-

und Tumorgewebstbereichen der Prostata verschiedener PCa-Patienten durchgeführt. Die konditionierten Kulturüberstände wurden jeweils 1:1 mit frischem EGM1-Medium versetzt.

2.2.1.8 Transfektion humaner Zelllinien mit Plasmid-DNA

Die Transfektion von Plasmid-DNA in PC-3- als auch LNCaP-Zellen erfolgte mittels des FuGene HD Reagent (Roche) anhand der Herstellerangaben. Hierbei wurden pro Well einer 6-Well-Platte 2 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Dauer der Überexpression betrug 24 h (für Promotor-Luziferase-Konstrukte) bzw. 72 h (für CAV1-Überexpression).

2.2.1.9 Transfektion von PC-3 mit siRNA

Für CAV1-Knockdown-Experimente wurden PC-3-Zellen mit validierter Silencer Select siRNA (Applied Biosystems) gegen CAV1 behandelt. Die Transfektion erfolgte hierbei mit Hilfe des siPORT NeoFX Transfection Agent (Applied Biosystems). Es wurden pro Transfektion im 6-Well-Format jeweils 5 nmol der Kontroll- (Silencer Select Negative Control No. 1) bzw. CAV1-siRNA mit einer Inkubationsdauer von 72 h verwendet.

2.2.1.10 Luziferase-Reporter-Gen-Assay

Die Analyse der Promotoraktivitäten in Abhängigkeit der Methylierung erfolgte durch Verwendung des Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) nach Angaben des Herstellers.

Behandlung der Promotorkonstrukte mit Methyltransferase M. SssI

Zur vollständigen Methylierung der Plasmid-Konstrukte wurden jeweils 2 µg mit der Methyltransferase M. SssI (NEB) für 1 h bei 37 °C nach Angaben des Herstellers behandelt, gefolgt von einem Inaktivierungsschritt bei 60 °C für 20 min. Folgender Ansatz wurde jeweils vereint:

2,0 µg	Plasmid-DNA
0,25 µl	Methyltransferase M. SssI
0,25 µl	SAM (S-Adenosyl-methionin)
2,0 µl	NEB2
ad 20,0 µl	Aqua dest

Transfektion der Plasmid-DNA in PC-3-Zellen

Pro Well einer 24-Well-Platte wurden 50.000 PC-3-Zellen ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Folgender Transfektionsansatz wurde am nächsten Tag zur Behandlung der Zellen verwendet:

500 ng	Plasmid-DNA (mit/ohne vorheriger M.SssI-Behandlung, bzw. pGL3-Promoter-Vektor als Kontrolle)
10 ng	pRL-TK-Vektor
0,75 µl	Fugene HD Reagent
ad 25 µl	OptiMem

Nach einer Inkubationszeit von weiteren 24 h wurden die transfizierten Zellen mit dem im Dual-Luciferase Reporter Assay enthaltenem PLB-Puffer (100 µl/Well) lysiert und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

Messung der Lumineszenz

Die Vermessung der Zelllysate (20 µl/Well) erfolgte in Duplikaten am Mithras LB 940-Plattenreader (Berthold) mittels automatischer Substratinjektion nach folgendem Programm:

Injektion von 50 µl LAR-Substrat (Messung der Firefly-Aktivität)
Verzögerung: 2 s
Messung: 10 s
Injektion von 50 µl Stop & Glow Reagent (Messung der Renilla-Aktivität)
Verzögerung: 2s
Messung: 10 s

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolation aus gefrorenem Gewebe und Zelllinien

Zur Isolierung von RNA aus gefrorenem Frischgewebe wurde der miRNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei wurde Gewebe zunächst im TissueLyser zerkleinert und zum Zellaufschluss mit 700 µl Qiazol versetzt. RNA wurde anhand einer Phenol/Chloroform-Behandlung und Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 g für 15 min extrahiert. Die in der oberen, wässrigen Phase vorhandene RNA wurde nach Angaben des Herstellers über eine Säule gereinigt und in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Isolierung aus Zelllinien erfolgte analog, jedoch ohne vorherige Zellzerkleinerung am TissueLyser.

2.2.2.2 Isolation genomischer DNA aus Formalin-fixiertem Gewebe und Zelllinien

Mit Hilfe des QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) wurde genomische DNA aus Paraffin-eingebettetem Gewebematerial nach Angaben des Herstellers isoliert. Hierbei wurden die mit einer Stanze gewonnenen Gewebestücke zunächst mit einem Skalpell zerkleinert und zur Paraffinentfernung in Xylol inkubiert. Nach dreitägigem Verdau mit Proteinkinase K wurde die DNA über eine Säule gereinigt und mit 30-50 µl EB-Puffer eluiert. Die Isolierung von genomischer DNA aus kultivierten humanen Zelllinien erfolgte anhand der Herstellerangaben des QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen).

2.2.2.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Ermittlung der RNA- oder DNA-Konzentrationen in den untersuchten Proben erfolgte am NanoDrop ND-1000. Die Bewertung der Reinheit erfolgte durch Bestimmung der Verhältnisse der optischen Dichten bei 260/280 nm und 260/230 nm. Dabei entspricht ein Verhältnis bei 260/280 nm von größer 1,8 einer reinen DNA-Isolierung, ein Verhältnis größer 2,0 einer reinen RNA-Isolierung.

Die Qualitätsbestimmung der aus Frischgewebe isolierten RNA-Proben erfolgte am Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) nach Angaben des Herstellers. Es wurden für die Analysen nur RNA-Proben mit einem RIN-Wert > 6 verwendet, um eine gute RNA-Qualität zu gewährleisten und Verfälschungen der Ergebnisse zu vermeiden.

2.2.2.4 Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA

Zur reversen Transkription wurde der Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet. Generell bestand ein Ansatz (20 µl Gesamtvolumen) aus folgenden Komponenten:

1-2 µg	Total-RNA
1,0 µl (2,5 µM)	Oligo(dT) ₁₈ -Primer
2,0 µl (60 µM)	Random-Oligonukleotide
ad 13,0 µl	RNase-freies Wasser

Dieser Ansatz wurde zunächst 10 min bei 65 °C inkubiert und dann sofort auf 4 °C heruntergekühlt. Für den Mastermix wurden folgende Komponenten pro Ansatz pipettiert:

4,0 µl	5x Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer
0,5 µl	Protector RNase Inhibitor (40 U/µl)

2,0 µl	dNTP-Mix (jeweils 10 mM)
0,5 µl	Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/µl)

Der 20 µl-Ansatz wurde im Block-Cycler bei 25 °C für 10 min, gefolgt von 30 min bei 55 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgte im Anschluss eine Inkubation des Ansatzes bei 85 °C für 5 min. Die fertige cDNA wurde bis zur weiteren Analyse bei -20 °C aufbewahrt. Bei den Analysen wurde als Negativ-Kontrolle ein Ansatz ohne reverse Transkriptase mitgeführt.

2.2.2.5 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

2.2.2.5.1 Genexpressionsanalysen mittels Universal Probe Library (UPL)-Sonden

In dieser Dissertation fanden spezielle Universal Probe Library (UPL)-Sonden der Firma Roche ihre Anwendung. Sie stellen kurze Oligonukleotide dar, die komplementär zu einem Bereich des zu detektierenden Amplikons sind. Am 5'-Ende ist die Sonde mit einem Fluoreszenzfarbstoff (6-FAM, 6-Carboxyfluorescein), am 3'-Ende mit einem Quencher markiert. Ein messbares Fluoreszenzsignal wird erst dann sichtbar, wenn die Sonde komplementär am Amplikon bindet und die UPL-Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase gespalten wird, so dass der Fluoreszenzfarbstoff nicht mehr gequencht und ein Signal detektierbar wird.

2.2.2.5.2 Ermittlung der Expressionseffizienz

Die Effizienz der RT-qPCR wurde durch das Erstellen von Standardkurven anhand einer Verdünnungsreihe ermittelt. Hierfür wurde cDNA aus RNA von kultivierten Zellen bzw. gepoolten RNA-Proben aus Gewebe zunächst auf die Expression des jeweiligen Gens untersucht. Die cDNA-Probe mit dem niedrigsten C_q-Wert wurde für eine Verdünnungsreihe eingesetzt, um einen möglichst großen Bereich abzudecken. Die cDNA wurde unverdünnt, 1:5, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 und 1:100.000 verdünnt nochmals in der RT-qPCR vermessen und die jeweils ermittelten C_q-Werte mit den jeweiligen Verdünnungsquotienten gleichgesetzt. Aus der Steigung der resultierenden Geraden lässt sich die Effizienz der PCR ermitteln. Bei der Annahme, dass sich pro Zyklus die PCR-Produkte verdoppeln, ergibt sich eine optimale Effizienz von 2. Die Effizienzen der untersuchten Gene lagen im allgemein akzeptierten Bereich zwischen 1,8 und 2,0 (siehe Anhang Tab. 7-13).

2.2.2.5.3 Durchführung der RT-qPCR

Die mRNA-Quantifizierung mittels RT-qPCR wurde im 96-Well-Platten-Format am LightCycler 480 (Roche) und anhand der Software-Version 1.3.0 durchgeführt. Hierbei wurde zur Anfertigung der Reaktionsansätze der LightCycler 480 Probes Master (Roche) verwendet. Alle Proben wurden in Triplikaten vermessen. Zudem wurden jeweils No Template-Kontrollen sowie Standard- und Kontrollproben zum Eineichen in die Standardkurve mitgeführt. Die Analyse von gepaarten Proben erfolgte auf derselben Platte. Pro 10 µl-Ansatz wurde 1 µl cDNA mit 1x Universal ProbesMaster, 250 nM der spezifischen Oligonukleotide, sowie 100 nM der UPL-Sonde zusammengefügt und folgendes PCR-Programm gefahren:

Schritt 1	Schritt 2			Schritt 3
Prä-Inkubation	Amplifikation			Kühlung
95°C	95°C	60°C	72°C	4°C
10 min	10 s	20 s	1 s	∞
1 Zyklus	45-55 Zyklen			

2.2.2.5.4 Auswertung der RT-qPCR-Ergebnisse

Die Auswertung erfolgte anhand der Software Genex (<http://multid.se>) auf der Basis der $\Delta\Delta C_q$ -Methode. Bei dieser Methode lassen sich aus den C_q -Werten fiktive Konzentrationen (conc) errechnen, indem man folgende Formel verwendet und die jeweils anhand der Standardkurvenerstellung ermittelte Effizienz (E) einbezieht:

$$\text{conc}(\text{Zielgen}) = E^{-(C_q(\text{Zielgen}) - C_q(\text{Referenzgen}))}$$

Aus dieser Berechnung ergibt sich die normierte fiktive Konzentration des zu untersuchenden Gens, normalisiert auf ein stabil exprimiertes Referenzgen (hier: TUBA1B).

Um die relative Veränderung der Genexpression zwischen Normal- und Tumorgewebe zu ermitteln, wurden Fold Changes (FC) anhand der folgenden Formel berechnet:

$$FC = \frac{E^{-(C_q(\text{Zielgen})_{\text{Tumor}} - C_q(\text{Referenzgen})_{\text{Tumor}})}}{E^{-(C_q(\text{Zielgen})_{\text{Normal}} - C_q(\text{Referenzgen})_{\text{Normal}})}}$$

2.2.2.6 Quantifizierung der Gen-Promotor-Methylierung

2.2.2.6.1 Natriumbisulfit-Behandlung genomischer DNA

Um zwischen unmethylierten und methylierten DNA-Abschnitten unterscheiden zu können, wurde die isolierte genomische DNA zunächst mit Natriumbisulfit behandelt. Durch die Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit wird über drei Schritte eine Desaminierung der Cytosine zu Uracil verursacht, die sich auf unmethylierte Cytosine beschränkt (Abb. 2-1). Zunächst erfolgt dabei eine Addition des Bisulfits an die Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 5 und 6, gefolgt von einer hydrolytischen Desaminierung, welche ein Uracil-Bisulfitderivat entstehen lässt. Die abschließende Abspaltung der Sulfonat-Gruppe unter alkalischen Bedingungen führt zur Entstehung von Uracil. Unmethylierte Cytosine lassen sich in einer folgenden PCR daher leicht von methylierten Cytosinen unterscheiden, da sie durch die Behandlung als Thymidine (Pendant zum Uracil) nachweisbar sind. Die Versuche wurden mit dem EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden in den Untersuchungen jeweils 2 µg genomische DNA konvertiert.

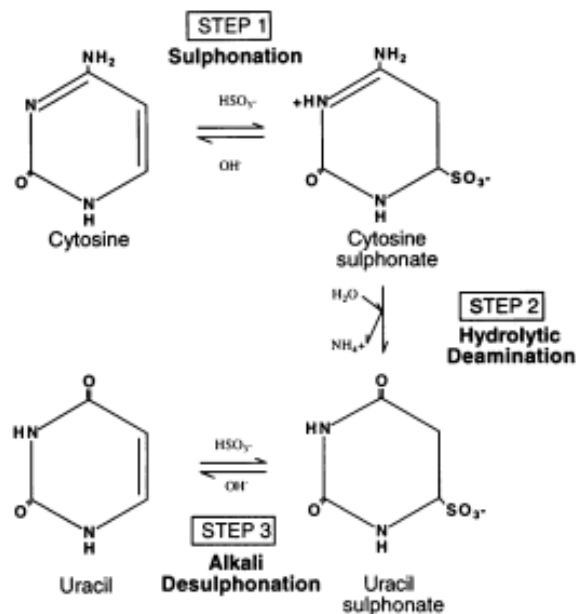


Abb. 2-1: Schematische Darstellung der Modifizierung unmethylierter Cytosine durch die Behandlung mit Natriumbisulfit. (Entnommen aus [181])

2.2.2.6.2 Quantifizierung der GSTP1-Promotormethylierung

Die DNA-Promotormethylierung des GSTP1-Gens wurde mit dem LightMix Kit GSTP1 (Epigenomics) im 96-Well-Format am LightCycler 480 (Roche) durchgeführt. Bei diesem Assay werden spezifisch für Natriumbisulfit-konvertierte DNA entwickelte Oligonukleotide verwendet, die methylierungsunspezifisch an das Template binden können und ein 126 bp-Fragment des Exon 1 des humanen GSTP1-Gens amplifizieren. Durch gleichzeitige Zugabe eines spezifischen Blocker-Oligonukleotids wird eine methylierungsspezifische Vervielfältigung gewährleistet, da dieses sich nur an eine unmethylierte Sequenz anlagern kann und so die Amplifikation unmethylierter Bereiche verhindert. Die Detektion der amplifizierten Fragmente erfolgt über eine methylierungsspezifische Hybridisierungssonde, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff LightCycler Red 640 markiert ist.

Zur Quantifizierung der gesamten Menge an Natriumbisulfit-konvertierter DNA (unabhängig vom Methylierungsgrad) wurde der LightMix Kit Reference G (Epigenomics) herangezogen. Dieser Assay beruht auf der Amplifikation einer 130 bp umfassenden Sequenz des humanen GSTP1-Gens, die sich 1 kb stromabwärts des Transkriptionsstarts befindet. Diese Region ist völlig frei von CpG-Dinukleotiden und erlaubt daher eine Detektion der gesamten DNA, unabhängig vom Methylierungsstatus.

Zur Quantifizierung wurde eine Standardkurve mit unterschiedlichen Konzentrationen Natriumbisulfit-konvertierter DNA erstellt. Hierfür wurden die Bisulfite DNA Quantification Standards (Epigenomics) nach Angaben des Herstellers verwendet. Jedem ermittelten Cq-Wert konnte anhand der Standardkurve eine genaue Konzentration an konvertierter DNA zugeordnet werden. Bei jeder Messung wurden Kontrollen mitgeführt (komplett methylierte, konvertierte DNA, no Template-Kontrolle). Der errechnete Quotient der ermittelten Konzentrationen aus methylierter DNA- und der Gesamt-DNA-Menge gab schließlich Aufschluss über den prozentualen Anteil der Methylierung im Promotor des GSTP1-Gens.

2.2.2.6.3 Quantifizierung der PITX2-Promotormethylierung

Die Ermittlung der Methylierungsrate des PITX2-Promotors erfolgte anhand des EpiTect MethyLight PCR Kit (Qiagen) sowie dem EpiTect MethyLight Assay: Hs_PITX2 Primer Mix (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die Diskriminierung von methylierter und nicht-methylierter DNA wird bei dieser Methode anhand des Einsatzes von zwei unterschiedlich markierten, sequenz-spezifischen TaqMan-Sonden (6'-FAM und VIC) realisiert. Somit lassen sich direkt die jeweiligen

Anteile an methylierter und unmethylierter DNA anhand der zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe mit Hilfe der folgenden Formel ermitteln:

$$\text{PITX2}[\%] = \frac{100}{1 + 2^{(\text{Cq}(\text{FAM}) - \text{Cq}(\text{VIC}))}}$$

2.2.2.6.4 Quantifizierung der RAR β 2- und APC-Promotormethylierung

Die Quantifizierung der Promotormethylierung des RAR β 2- bzw. APC-Gens erfolgte mit Hilfe von etablierten, methylierungsspezifischen Oligonukleotiden anhand einer quantitativen, methylierungsspezifischen PCR (qMSP). Zur Ermittlung der Konzentrationen wurden Standardkurven für RAR β 2-, APC und β -Aktin mittels universell methylierter DNA (Qiagen) angefertigt. Zur Bestimmung der Gesamt-DNA wurde ein Sequenzbereich des β -Aktin-Gens gewählt, welcher keine CpG-Dinukleotide enthielt. Die Berechnung des prozentualen Anteils der methylierten DNA erfolgte anhand folgender Formel:

$$\text{RAR}\beta 2 \text{ bzw. APC}[\%] = \frac{\text{conc}_{(\text{RAR}\beta 2 \text{ bzw. APC})}}{\text{conc}_{(\beta\text{-Aktin})}} \cdot 100$$

2.2.2.6.5 MethylProfiler-Analyse

Neben den Analysen zum prostaticen Methylierungsfeldeffekt wurde ein weiteres Profiling-Verfahren zur Identifizierung möglicher Methylierungsmarker angewandt, welches keine vorherige Natriumbisulfitbehandlung der genomischen DNA erforderte. Anhand der Herstellerangaben wurden mittels des MethylProfiler DNA Methylation PCR Array-Systems (Qiagen) weitere 21 Gene (als auch GSTP1, RAR β 2 und APC) auf differenzielle Methylierungsmuster in Tumor- und korrespondierenden Normalgewebeprobe von 6 Patienten analysiert.

Bei dieser Methode werden methylierungssensitive und/oder methylierungsabhängige Restriktionsenzyme eingesetzt, die genomische DNA in Abhängigkeit des Methylierungszustandes verdauen. Gleiche Mengen jeder DNA-Probe wurden (1) ohne Enzyme, (2) mit einem methylierungssensitiven Enzym, (3) mit einem methylierungsabhängigen Enzym und (4) mit beiden Enzymen behandelt (über Nacht bei 37°C), bevor die jeweiligen DNA-Anteile

(unmethyliert, methyliert, intermediär methyliert) anhand von Primern, die den jeweiligen Promotorbereich des zu untersuchenden Gens amplifizierten, analysiert wurden. Ansatz (1) lieferte dabei den Gehalt der Gesamt-DNA, die für die Reaktion eingesetzt wurde. Durch die Behandlung mit dem methylierungssensitiven Enzym wurde unmethylierte und partiell methylierte DNA verdaut, die methylierte DNA konnte dabei über die qPCR ermittelt werden. Das methylierungsabhängige Enzym verdaute methylierte DNA, wobei verbliebene unmethylierte Anteile durch qPCR bestimmt werden konnten. Durch den zur Qualitätskontrolle durchgeführten Doppelverdau konnte zudem der Anteil der DNA ermittelt werden, der für einen Restriktionsverdau nicht zugänglich war.

2.2.2.7 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von PCR-Produkten wurden 1-3%ige (w/v) Agarosegele (Agarose gelöst in 1xTBE-Puffer) verwendet. Nach dem Aufkochen wurde die Agarose-Lösung mit 0.001 % (v/v) Ethidiumbromid (50 µg/ml) versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren wurde die Kammer mit 1xTBE-Puffer (Laufpuffer) gefüllt und die vorher mit 5x Ladepuffer versetzten Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 130 mA für 30 – 60 min. Banden wurden mit Hilfe des Fluoro-S Multimager (Bio-Rad) visualisiert und mittels der Quantity-One Software (Bio-Rad) ausgewertet.

Spezifische Fragmente wurden mittels des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers eluiert. Hierbei wurde das Gelstück mit QG-Puffer versetzt und 10 min bei 50 °C zur Auflösung der festen Agarosestruktur inkubiert. Die Lösung wurde auf eine QIAquick Säule gegeben und kurz zentrifugiert. Die gebundenen Nukleinsäuren wurden mit Ethanol-versetzten Puffern gewaschen und mit EB-Puffer von der Säule eluiert.

2.2.2.8 Klonierung

Für Promotor-Reportergen-Analysen und Bisulfit-Sequenzierung war es nötig, bestimmte DNA-Fragmente in spezielle Vektoren zu klonieren. Alle Fragmente wurden zunächst in den pCR2.1-TOPO- bzw. pCR Blunt II-Vektor (Invitrogen) kloniert und anschließend zur Überprüfung sequenziert (durch LGC Genomics, Berlin).

2.2.2.8.1 TOPO-TA-Klonierung

Für die Bisulfit-Sequenzierung des CAV1-Promotors wurden die amplifizierten Fragmente in den pCR2.1 TOPO-Vektor (linearisiert durch kovalent gebundener Topoisomerase) kloniert. Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus:

4,0 µl	aufgereinigtes PCR-Produkt
1,0 µl	Salt Solution
1,0 µl	pCR2.1 TOPO-Vektor (bzw. pCR Blunt II, siehe 2.2.2.8.2)

Der Reaktionsansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 2 µl des Ansatzes zu chemokompetenten OneShot TOP10-Zellen (Invitrogen) pipettiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Transformation wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 s durchgeführt. Nach 2-minütiger Inkubation des Ansatzes auf Eis wurde SOC-Medium hinzugesetzt und die transformierten Zellen unter Schütteln für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 – 150 µl des Ansatzes auf Antibiotikum-haltigen (100 µg/ml) LB-Agar-Platten (mit 40 µg/µl X-Gal für Blau-Weiß-Selektion) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5-10 einzelne Klone mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und 2 ml neues Antibiotikum-haltiges Medium damit angeimpft. Zur Sicherung der Klone wurde zusätzlich eine Masterplatte angelegt.

2.2.2.8.2 Zero Blunt TOPO-TA-Klonierung

Für die Konstruktion der Plasmide der Promotor-Reporter-Gen-Analyse sowie die Herstellung eines CAV1-exprimierenden pcDNA3.1(-)-Vektors wurde das jeweilige Fragment mittels einer proof reading Pfx Taq Polymerase (Invitrogen) amplifiziert. Da dieses Enzym Fragmente generiert, die einen A-Überhang aufweisen, wurde ein zu diesem Fragment passender Vektor mit T-Überhang benutzt, dem pCR Blunt II TOPO-Vektor (Invitrogen). Die Blunt-Klonierung erfolgte in gleicher Weise wie unter 2.2.2.8.1 beschrieben.

2.2.2.8.3 Klonierung der Promotor-Plasmid-Konstrukte

Um die CAV1-Promotor-Methylierung genauer zu untersuchen, wurden Reporter-Gen-Assays durchgeführt. Hierfür wurden Plasmid-Konstrukte generiert, die sowohl das Luziferase-Gen als auch verschiedene CAV1-Promotorabschnitte enthielten. Zur weiterführenden Klonierung wurden alle verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation des zu untersuchenden Genabschnittes mit

einer KpnI(5')- sowie einer SacI(3')-Restriktionsschnittstelle versehen. Die jeweiligen Konstrukte wurden zunächst mit Hilfe der Pfx Taq Polymerase (Invitrogen) generiert, auf ein Agarosegel aufgetragen, eluiert und in den Zero Blunt-Vektor kloniert. Nach Überprüfung der Sequenz durch Sequenzierung (LGC Genomics) wurden die jeweiligen Fragmente mit Hilfe der Restriktionsenzyme KpnI und SacI aus dem Vektor herausgeschnitten. Für die Promotoranalysen wurden die Fragmente in den pGL3-Basic-Vektor subkloniert, welcher als Reportergen das Firefly Luziferase-Gen enthält, jedoch frei von jeglichen Promotorstrukturen ist. Somit ließen sich Einflüsse von Promotorabschnitten anhand der Luziferaseexpression bzw. -aktivität ermitteln. Um für das Einfügen der Fragmente komplementäre Schnittstellen im Vektor zu generieren, wurde auch dieser mit den besagten zwei Restriktionsenzymen geschnitten. Die Aufreinigung des linearisierten Vektors erfolgte über ein Agarosegel mit anschließender Elution. Zur Ligation der Fragmente in den pGL3-Basic-Vektor wurde folgender Ansatz für 1 h bei Raumtemperatur zusammengefügt:

1,0 µl	T4 DNA-Ligase
2,0 µl	10x T4 DNA-Ligase-Puffer
4,0 µl	geschnittenes Fragment
2,0 µl	geschnittener Vektor
ad 20,0 µl	Aqua dest

Die Transformation der ligierten Plasmid-DNA in $\text{dam}^-/\text{dcm}^-$ -chemokompetente Zellen (NEB) erfolgte mittels eines Hitzeschocks bei 42 °C für 30 s. Anschließend wurden die transformierten Zellen 2 min auf Eis gehalten und mit 250 µl SOC-Medium versehen. Zur Erholung erfolgte eine Inkubation der Zellen bei 37 °C für 1 h unter leichtem Schütteln. Aus diesem Ansatz wurden jeweils 50 µl Zellen auf Ampicillin-haltige Agar-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das Picken einzelner Kolonien, Anlegen einer Masterplatte und Animpfen einer 2 ml-Flüssigkultur sowie eine Mini-PCR (2.2.2.9).

2.2.2.8.4 Klonierung des pcDNA3.1(-)-CAV1-Expressionsvektors

Die Klonierung erfolgte weitestgehend nach der unter 2.2.2.8.3 beschriebenen Methode, jedoch wurde die kodierende Sequenz des CAV1-Gens mit Schnittstellen für EcoRI (forward), sowie BamHI (reverse) versehen. Die Subklonierung erfolgte in den pcDNA3.1(-)-Expressionsvektor.

2.2.2.9 Mini-PCR

Zur ersten Überprüfung einer erfolgreichen Fragmentklonierung wurde die so genannte Mini-PCR mittels dem Platinum PCR Supermix High Fidelity Mix (Invitrogen) direkt auf der Kolonie nach

Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine gepickte Kolonie wurde kurz in folgendem Ansatz geschwenkt:

49,0 µl	1x Platinum PCR SuperMix HighFidelity
1,0 µl	Primer-Mix (jeweils 400 nM Primer-Endkonzentration)

Der Ansatz wurde zur Denaturierung bzw. Enzymaktivierung zunächst bei 94°C für 5 min inkubiert. Danach erfolgten 30 Zyklen des folgenden Programmes: Denaturierung: 94 °C, 30 s; Annealing: 55°C, 30 s; Extension: 68 °C, 1 min pro 1 kb.

2.2.2.10 Isolierung der Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus transformierten E.coli-Zellen erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.2.2.11 Analytischer Restriktionsverdau

Um zu überprüfen, ob die isolierte Plasmid-DNA das gewünschte Fragment enthält, wurde jeweils ein Restriktionsverdau durchgeführt. Hierbei wurden 1-2 µg Plasmid-DNA mit je 1 µl der spezifischen Restriktionsenzyme und dem dazugehörigen 1xNEB-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte durch eine Agarosegelelektrophorese.

2.2.2.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung diverser Plasmid-DNA in dieser Dissertation erfolgte durch LGC Genomics GmbH (Berlin).

2.2.2.13 Bisulfit-Sequenzierung

Der Vorteil der Bisulfit-Sequenzierung gegenüber der herkömmlichen methylierungsspezifischen PCR besteht darin, dass sie eine direkte Bestimmung des Methylierungszustandes eines jeden CpG-Dinukleotids in der zu untersuchenden Sequenz ermöglicht. Allerdings stellt jede Sequenzierung ein einzelnes Allel dar. Um daher statistische Aussagen zum Gesamtzustand der Methylierung in der Probe treffen zu können, müssen mehrere Klone sequenziert werden.

Der erste Schritt bei dieser Methode liegt in der Konvertierung der aus archiviertem Gewebe und Zelllinien isolierten genomischen DNA mit Natriumbisulfit (2.2.2.6.1). Zur

Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Abschnittes kamen daher speziell für konvertierte DNA komplementäre Oligonukleotide zum Einsatz (siehe Anhang Tab. 7-3). Das PCR-Produkt wurde über ein Gel aufgereinigt und aus diesem eluiert (2.2.2.7). Anschließend erfolgte die Klonierung des Fragmentes in den TOPO-TA-Vektor (2.2.2.8.1). Nach erfolgreicher Transformation wurden 5-10 Klone von der Platte gepickt, Mini-Kulturen angefertigt und Plasmid-DNA isoliert. Die erfolgreiche Klonierung und demnach das Vorhandensein des gewünschten Fragments wurde mittels eines EcoRI-Restriktionsverdau überprüft. Die Sequenzierung erfolgte durch LGC Genomics GmbH (Berlin).

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinisolierung mittels Ripa-Puffer

Zur Proteinisolierung wurden die Zellen zunächst mittels Trypsin/EDTA vom Kulturflaschenboden gelöst und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde mit Protease-Inhibitoren versetztem Ripa-Puffer (für Pufferzusammensetzung siehe Anhang, Tab. 7-7) homogenisiert (150 µl auf $5 \cdot 10^6$ Zellen), 2 h bei 4 °C inkubiert und anschließend 20 min bei 4 °C zentrifugiert (15.000 g). Der das Zelllysate enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C bis zur Analyse aufbewahrt.

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bradford

Die Proteinkonzentrationen der Zelllysate wurden kolorimetrisch anhand des Bradford-Assays (Bio-Rad) ermittelt. Die Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 an Proteine in saurer Lösung verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximum von 465 auf 595 nm, wodurch eine Bestimmung des Proteingehaltes in der Probe möglich wird. Die Konzentrationsermittlung erfolgte durch einer Standardkurve mit Rinderserumalbumin (BSA) in verschiedenen Konzentrationen.

2.2.3.3 Western Blot (Semi Dry Blotting)

Zur Auftrennung der Proteine nach Größe mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden zunächst 20 – 40 µg des Proteinlysates mit 2x Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf ein denaturierendes, SDS-haltiges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 15 mA (Sammelgel) und 30 mA (Trenngel).

Der Proteintransfer vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (0,45 µm) erfolgte mittels einer Hoefer-Apparatur. Zur Aktivierung der PVDF-Membran wurde diese zunächst für 1 min in Methanol inkubiert, anschließend zweimal 10 min mit Aqua dest. gewaschen und 10 min in Anodenpuffer I inkubiert. Das Gel wurde vor dem Blotten 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 0,8 mA/cm² (45 mA/Gel) für 1 h. Anschließend erfolgte das Blocken der Membran in 2%iger Magermilch in 1x t-TBS über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Primärantikörperinkubation für 1 h durchgeführt, gefolgt von 3x 10 min Waschen mit t-TBS. Mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper wurden für 1 h auf den Blot gegeben und bei Raumtemperatur unter Bewegung inkubiert. Nach 3x 10 min Waschen mit 1x t-TBS wurden die markierten Banden mittels einer ECL-Lösung (Thermo Scientific) am Fluoro-S Multimager (Bio-Rad) detektiert und mit der ImageJ-Software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) quantifiziert.

Um gebundene Antikörper wieder zu entfernen und eine weitere Färbung zu ermöglichen, wurde die Membran mit Stripping-Puffer (siehe Anhang Tab. 7-7) für 30 min bei Raumtemperatur bewegt und anschließend zweimal 10 min mit t-TBS gewaschen. Danach konnte ein erneutes Blocken mit folgender Antikörperinkubation erfolgen.

2.2.3.4 MMP2- und MMP9-Aktivitätsbestimmung mittels Zymographie

Um zu überprüfen, ob die CAV1-Expression Einfluss auf die Expression und Aktivität der extrazellulären Metalloproteinasen MMP2 und -9 besitzt, wurden die MMP-Aktivitäten mit der Zymographie eingeschätzt. Da beide MMPs Gelatine als Substrat benutzen, ist die Messung anhand des Abbaus von Gelatine in einem nicht-reduzierenden Gel die Methode der Wahl.

In 6-Well-Platten ausgesäte und behandelte LNCaP- und PC-3-Zellen wurden 24 h vor Beginn der Zymographie in serumfreiem Medium inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Aufarbeitung der die Metalloproteinasen enthaltenden Zellüberstände mittels Gelatine-Agarosebeads (Sigma-Aldrich). Nach einer Inkubationsdauer von 2 h wurden die Beads vom Zellüberstand befreit, mehrmals mit 1xPBS gewaschen und mit nicht-reduzierendem Gel-Ladepuffer versetzt. Die Überstände wurden zur Auftrennung der Proteine auf ein Gelatine-haltiges Acrylamidgel gegeben und eine Elektrophorese auf Eis bei 15 mA für 30 min und 20 mA (180 mV) für ca. 2 h durchgeführt. Nach der Auftrennung erfolgten vier Waschschrte à 30 min und die Gelinkubation über Nacht bei 37 °C unter stetigem Schwenken mit Tween 20-haltigem Inkubationspuffer. Das Gel wurde am nächsten Tag zur Visualisierung der Bereiche, in denen die Gelatinasen aktiv ihr Substrat verbraucht hatten, anhand einer einstündigen Inkubation mit Commassie Brilliant Blue eingefärbt. Nach Zugabe des Entfärbers wurden die Banden als helle

Stellen im blau gefärbten Gel sichtbar. Zur Haltbarmachung wurde das Gel mit einem Glycerin/Wasser-Gemisch mindestens 1 h unter Schwenken inkubiert und zwischen zwei Folien mehrere Tage getrocknet. Zur Archivierung und Auswertung wurde das Gel gescannt und mittels der ImageJ-Software ausgewertet.

2.2.4 Immunhistochemische Untersuchungen

2.2.4.1 Erstellung eines Tissue-Mikroarray (TMA)

Zur zeit- und kostensparenden Analyse einer Vielzahl von Patienten wurde ein so genannter Tissue-Mikroarray (TMA) angefertigt und analysiert (schematische Darstellung siehe Abb. 2-2). Hierbei wurden mit Hilfe eines Stanzapparates aus zuvor genauestens verifizierten Normal- und Tumorbereichen des archivierten Gewebematerials kleine Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 1,5 mm entnommen. Diese Gewebestanzungen wurden in einen neuen Paraffinblock transferiert. Am Mikrotom wurden Gewebeschnitte angefertigt und anhand dieser die immunhistochemische Färbung durchgeführt. Mittels der TMA-Methode ließ sich so eine große Fallzahl mit nur einem Gewebeschnitt zeitsparend analysieren.

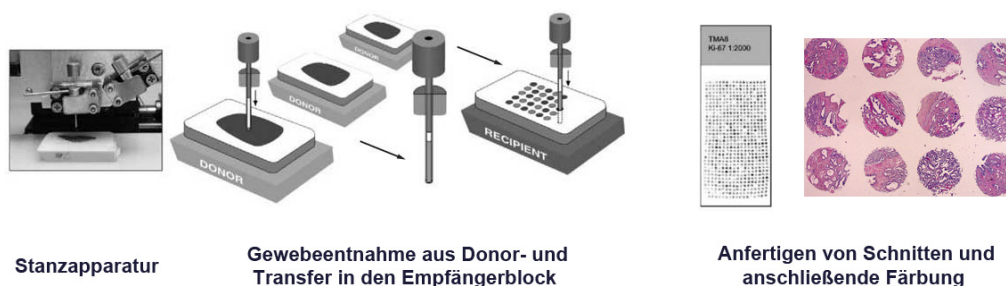


Abb. 2-2: Herstellung eines Tissue-Mikroarrays anhand einer Stanzapparatur. Durch Verwendung zylinderförmiger Hohlstanzen kann Gewebe aus einem Donorgewebekblock in einen Empfängerblock transferiert werden. Nach Anfertigung dünner Schnitte kann die immunhistologische Färbung spezifischer Proteine erfolgen. (Modifiziert nach [182])

2.2.4.2 Hämatoxylin¹⁰/Eosin¹¹ (H&E)-Färbung

Zur Visualisierung zellulärer Gewebsstrukturen wurde eine H&E-Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte zunächst durch dreimalige Inkubation in Xylol (je 5 min) entparaffiniert. Um überschüssiges Xylol zu entfernen, wurden die Gewebeschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe gespült (3x Ethanol (100 %), 1x Ethanol (96 %), 1x Ethanol (80 %), 1x Ethanol (70 %), 1x Aqua dest). Danach erfolgte die Färbung mit Hämalun für 7 min und Bläuen unter fließendem Wasser. Im Anschluss wurde die Färbung mit Eosin für 5 min durchgeführt und die Schnitte in Aqua dest gewaschen. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe getaucht (1x Ethanol (70 %), 1x Ethanol (80 %), 1x Ethanol (96 %), 3x Ethanol (100 %)). Es erfolgte eine 5-minütige Inkubation in Xylol, wonach sich das „Eindecken“ in Pertex (Xylol-haltig) anschloss. Nach zweitägiger Trocknung wurden die Schnitte archiviert.

2.2.4.3 Immunhistochemie mittels der LSAB-Methode

In dieser Dissertation wurde die LSAB (Labeled Streptavidin-Biotin)-Methode nach Angaben des Herstellers angewandt (LSAB-System Test, DAKO). Zunächst wurden Gewebeschnitte von Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Archivmaterial entparaffiniert (3x 10 min Xylol) und zur Xylolentfernung in einer absteigenden Alkoholreihe (3x Ethanol (100%), 1x Ethanol (96%), 1x Ethanol (80%), 1x Ethanol (70%), 1x Aqua dest) inkubiert. Bei der sich anschließenden Hitzedemaskierung wurden die entparaffinierten Gewebeschnitte in Citratpuffer (pH 6,0) im Schnellkochtopf für 5 min erhitzt, anschließend im Wasserbad abgekühlt und 10 min in 1xTBS inkubiert. Mit einem hydrophoben Wachsstift wurden die Gewebeschnitte auf dem Objektträger markiert. Nach 10-minütigem Blocken unspezifischer Bindungen mit Proteinblock erfolgte die 1-stündige Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper. Nach kurzem Spülen der Schnitte mit Aqua bidest, TBS-Tween (0,025%) und 1xTBS erfolgte die Sekundärantikörperinkubation (Biotinylated Link, Mischung aus Anti-Maus und Anti-Kaninchen) für 20 min. Nach Spülen mit 1x TBS wurden die Schnitte mit Streptavidin-markierter alkalischer Phosphatase für weitere 20 min inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurde mittels Fast FastRed Naphthol (Sigma-Aldrich) visualisiert. Die Inkubationsdauer der Färbelösung lag bei 5-20 min und wurde durch Spülen mit Leitungswasser gestoppt. Zur Gegenfärbung wurde eine Hämalun-Färbung für 60-90 s durchgeführt und die Schnitte unter fließendem Wasser gebläut. Das Eindecken der gefärbten

¹⁰ **Hämatoxylin:** =Hämalun; färbt Zellkerne und zytoplasmatische Strukturen, die reich an endoplasmatischem Retikulum sind

¹¹ **Eosin:** Färbt andere zytoplasmatische Bestandteile und faserige Strukturen der extrazellulären Matrix

Schnitte erfolgte mit Aquatex (Merck). Nach zweitägiger Trocknungsphase konnten die Schnitte eingelagert werden.

2.2.4.4 Bestimmung der Mikrogefäßdichte (MVD)

Die Ermittlung der MVD erfolgte am TMA nach der von Weidner et al. [139] beschriebenen Methode. Die Evaluierung der MVD im jeweiligen TMA-Spot erfolgte bei 40-facher Vergrößerung in einer sichtbaren Fläche von 0,196 mm² in einem Tumorareal mit hoher Angiogenese. Jede gefärbte Zelle wurde dabei als ein separates Mikrogefäß angesehen. Die ermittelte Gefäßanzahl wurde auf eine Fläche von 1 mm² extrapoliert.

2.2.5 Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen wurden unter Verwendung der Software-Programme SPSS (Version 18 und 19) und GraphPad Prism 5.0 durchgeführt. Zur Signifikanzbestimmung der Genexpressionen endothelialer Faktoren wurde der parameterfreie Wilcoxon-Test für gepaarte Daten angewandt. Die Ermittlung möglicher Unterschiede zwischen ungepaarten Daten zweier Gruppen erfolgte durch Benutzung des Mann-Whitney-U-Tests. Drei Gruppen wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests ausgewertet. Das diagnostische Potenzial der endothelialen mRNA-Expression wurde mit der Receiver Operating Characteristic (ROC)-Analyse unter Bestimmung des AUC (area under the curve) -Wertes abgeschätzt. Zur Darstellung signifikanter Unterschiede in der univariaten Überlebensanalyse wurde der Log Rang-Test verwendet. Korrelationen der endothelialen Genexpressionen erfolgten anhand der Spearman-Korrelationsmatrix. Resultierende p-Werte <0,05 wurden als signifikant gewertet.

2.2.5.1 Receiver Operating Characteristic (ROC)-Analyse

Bei der ROC-Analyse handelt es sich um eine Methode zur Grenzwertoptimierung, bei der für jeden möglichen Cut-Off-Wert die relative Häufigkeitsverteilung ermittelt und die dazu gehörende Sensitivität¹² und Spezifität¹³ berechnet wird. Durch Auftragung der ermittelten Sensitivität (Ordinate) gegen 1-Spezifität (Abzisse) ergibt sich im Idealfall eine parabelähnliche Darstellung. Je

¹² **Sensitivität:** Anteil der richtig positiv erkannten Patienten aller Erkrankten

¹³ **Spezifität:** Anteil der richtig negativ erkannten Patienten aller Nicht-Erkrankten

stärker diese sich von einer durch den Nullpunkt verlaufenden 45°-Diagonale unterscheidet, desto besser ist die Trennschärfe des diagnostischen Tests. Die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC¹⁴), deren Wert zwischen 0,5 und 1,0 liegen kann, gibt Aufschluss über die Eignung des untersuchten Faktors als diagnostisches Hilfsmittel, um erkrankte Patienten von gesunden Personen unterscheiden zu können. Je deutlicher die AUC gegen 1 geht, desto besser ist eine Trennung zwischen zwei definierten Gruppen möglich.

2.2.5.2 Univariate Kaplan-Meier-Überlebensanalyse

Zur Abschätzung der Prognose eines Patienten im Verlauf seiner Erkrankung können univariate Kaplan-Meier-Überlebensanalysen zu Rate gezogen werden. Bei der Überlebensanalyse wird die Zeit bis zum Eintreten eines bestimmten Ereignisses zwischen zwei Gruppen verglichen und anhand des Log Rang-Tests eventuelle signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt. Diese statistische Analyse ermittelt spezifische Überlebensraten oder -zeiten, wobei das Ereignis nicht zwingend der Tod sein muss. Vielmehr können auch andere Endpunkte, wie der Ausbruch einer Krankheit, die Genesung oder auch der erneute Ausbruch einer bereits überstandenen Krankheit (Rezidiv) gewählt werden. Das Auftreten von Rezidiven als Endpunkt ist der wesentliche Bestandteil zur Ermittlung der prognostischen Aussagekraft eines zu untersuchenden Biomarkers.

Bei der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse ist es nicht zwingend notwendig, dass alle Patienten eine identische Beobachtungszeit aufweisen. Fällt ein Patient während der laufenden Studie aus der Analyse, so werden die Daten „zensiert“, da nicht alle Werte einer statistischen Variablen bis zum Studienende beobachtet werden konnten.

¹⁴ **AUC:** Area Under the Curve

3 Ergebnisse

3.1 DNA-Promotor-Hypermethylierung beim Prostatakarzinom

Als frühes Ereignis in der Tumorgenese kann die DNA-Promotor-Hypermethylierung die Expression wichtiger Gene beeinflussen. Die Ermittlung eines möglichen epigenetischen Methylierungsfeldeffektes stand daher im Mittelpunkt der Analysen, um das Verwendungspotenzial der Promotorhypermethylierung als frühen Marker des Prostatakarzinoms zu untersuchen.

3.1.1 Untersuchung des Methylierungsfeldeffektes in der Prostata

Archiviertes, Formalin-fixiertes Gewebe von 25 Patienten wurde zur Analyse der Promotor-Hypermethylierung von vier ausgewählten Genen (GSTP1, APC, RAR β 2, PITX2) verwendet. Nach genauer pathologischer Verifizierung gesunder und erkrankter Bereiche wurden pro Fall jeweils eine Gewebeprobe aus dem Tumorbereich, sowie mindestens zwei weitere aus dem tumorangrenzenden Normalbereich in genau definierten Abständen zum Tumorherd entnommen (siehe Tab. 3-1). Zusätzlich wurden komplett PCa-freie Gewebeproben von zystoprostat-ektomierten¹⁵ Patienten als Kontrollen zur Ermittlung der Methylierung im gesunden Gewebe mitgeführt. Die Methylierungsanalyse der einzelnen untersuchten Gene wurde anhand verschiedener kommerziell erhältlicher Kits bestimmt, um eine gut funktionierende und etablierte Methode zu gewährleisten.

Um einen genauen Grenzwert zu finden, der überschritten werden muss, damit eine vorhandene Methylierung als real bewertet werden kann, wurde zunächst das Detektionslimit der Methylierung für die Gene mit im Kontrollgewebe kaum messbarer Methylierung bestimmt. Hierbei wurde als Template universell methylierte genomische DNA, in unterschiedlichen Verhältnissen mit unmethylierter DNA verdünnt, eingesetzt. Die Menge an methylierter DNA, die zweifelsfrei anhand der verschiedenen Assays nachweisbar war, wurde als Grenzwert zur Beurteilung einer vorhandenen Methylierung herangezogen. Anhand dieser Methode ergab sich für GSTP1 ein prozentualer Anteil von 1,0 % und für RAR β 2 bzw. APC ein Wert von 0,1 %, welcher

¹⁵ **Zystoprostatektomie:** operative Entfernung von Harnblase (Zystektomie) und Prostata (Prostatektomie). Sie ist das Standardverfahren zur Therapie des Harnblasenkarzinoms.

als Grenze der Detektierbarkeit gewertet wurde. Unterhalb dieser Grenzwerte liegende Methylierungsraten wurden demnach als „nicht methyliert“ angesehen. Eine weitere Stratifizierung der Ergebnisse erfolgte anhand der Methylierungsgrade im Kontrollgewebe, wobei der höchste ermittelte Wert in den Kontrollen zusätzlich als Grenzwert einer erhöhten Methylierung im Tumorgewebe herangezogen wurde. Somit ergab sich für RAR β 2, APC und PITX2 eine Methylierungsrate von 0,27 %, 0,89 % bzw. 37,61 %, die im Tumorgewebe mindestens überschritten werden musste, um als erhöht zu gelten.

Tab. 3-1: Charakteristika der Tumorgewebeproben und des tumorfreien Kontrollgewebes, sowie Angaben der Distanzen der entnommenen tumorangrenzenden Normalgewebe aller untersuchten Patienten (n=25). PSA, Prostata-spezifisches Antigen; PZ, periphere Zone; TZ, Transitionalzone; C1-C6, Kontrollgewebe 1-6; PCa, Prostatakarzinom; BPH, benigne Prostatahyperplasie; *, PIN, prostatiche intraepitheliale Neoplasie; **, Atrophie (Gewebschwund) (modifiziert nach [183])

	Tumorgewebe					tumorangrenzendes Normalgewebe		
						Entfernung vom Tumor [mm]		
Fall	Alter [Jahre]	PSA [ng/ml]	pT	Gleason Score	Tumorklassifizierung	1.	2.	3.
1	66	12,7	3a	4+3	PZ	3*	5	
2	54	6,4	3a	3+4	TZ	2	10	
3	65	7,6	3a	4+3	PZ	1*	2	9
4	72	6,3	3a	3+4	PZ	3	12	
5	68	8,4	3a	3+4	TZ	2	3	
6	66	5,0	2c	3+4	PZ	2	10	
7	59	5,6	3a	3+4	PZ	2	6	
8	72	6,4	2c	3+4	PZ	2**	3	
9	64	n/a	2c	3+4	PZ	3	11	
10	74	28,5	3a	4+3	PZ	3	7	
11	60	9,2	2c	3+2	TZ	3	7	>20
12	65	5,0	3a	4+3	PZ	3	10	30
13	63	1,5	2c	3+4	PZ	3	11	
14	66	4,9	2c	3+4	PZ	3	9	
15	66	8,7	3a	3+4	PZ	5	20	
16	66	5,4	2c	4+3	PZ	3	6*	
17	73	6,3	3a	3+4	PZ	2	15	
18	51	8,5	2c	4+3	PZ	3	6	
19	57	19,0	2c	3+3	PZ	3	22	
20	74	22,0	3b	4+3	PZ	3	15	
21	66	9,6	3a	3+3	PZ	3	25	
22	61	6,1	3a	4+3	PZ	3	15	
23	69	4,4	3b	4+3	PZ	3	20	
24	65	10,6	2c	3+4	PZ	2	13	
25	73	9,9	2c	4+3	PZ	2	8	
Kontrollgewebe								
	Alter [Jahre]	Gewebeursprung						
C1 + C2	73	PCa-freie Zystoprostektomie, entnommen aus verschiedenen Regionen						
C3	57	BPH						
C4	68	PCa-freie Zystoprostektomie						
C5	78	PCa-freie Zystoprostektomie						
C6	18	PCa-freie Zystoprostektomie						

Die Methylierung im Promotorbereich des GSTP1-Gens beschränkte sich im untersuchten Kollektiv auf das Tumorgewebe. Dabei zeigten 84 % (21/25) der untersuchten Tumorproben sowie zwei von drei analysierten PIN-Proben eine signifikant erhöhte GSTP1-Methylierung, die Werte zwischen 2,7 % und 44,0 % annahm ($p < 0,0001$, Abb. 3-1A). Angrenzendes Gewebe zeigte keine, über das Detektionslimit herausragende Methylierung. Die tumorfreien Kontrollen verhielten sich dem entsprechend.

Die Analyse der RAR β 2-Promotormethylierung ergab in 96 % (24/25) aller untersuchten Tumorgewebeproben deutlich erhöhte Methylierungsraten (0,6 %-12,2 %) im Vergleich zum tumorfreien Kontrollgewebe (Abb. 3-1B). Des Weiteren zeigten alle PIN-Gewebeproben eine erhöhte Methylierung (3,3 %, 3,6 % bzw. 1,5 %). Mehr als die Hälfte der Patienten (72 %, 18/25) wiesen zusätzlich eine erhöhte Methylierung in einem oder in beiden angrenzenden Normalgewebeproben auf. Im Gegensatz dazu wies Patient 19 eine höhere Methylierung im 22 mm entfernten tumorangrenzenden Normalgewebe auf, die im Tumor selbst nicht erkennbar war. Durch eine erneute histologische Verifizierung dieser Geweberegion konnte das Vorhandensein von Tumorzellen oder PIN-Arealen sicher ausgeschlossen werden.

Für das APC-Gen konnte eine erhöhte Methylierung im Tumor in 84 % aller untersuchten Patienten (21/25) sowie in 2/3 PIN-Gewebeproben erkannt werden, die in einem Bereich von 1,0 %-26,8 % lag (Abb. 3-1C). Die Patienten 1, 3, 5, 13 und 19 wiesen zudem erhöhte Promotormethylierung im tumorangrenzenden Normalgewebe auf. Wie bereits für RAR β 2 beschrieben, wies Fall 19 eine kaum detektierbare Methylierung im Tumor auf, die im tumornahen Normalgewebe deutlich erhöht vorlag.

Eine Methylierung im Promotorbereich des PITX2-Gens konnte für alle untersuchten Proben gefunden werden, einschließlich im komplett tumorfreien Kontrollgewebe. Verglichen mit dem Kontrollgewebe zeigten 80 % (20/25) der Tumorproben eine höhere Methylierung, die auch in zwei PIN-Proben erkennbar war. Eine über den Wert der Kontrollgruppe gehende Methylierung wurde in zwei analysierten Fällen (Fall 14 und 23, entnommen 3 mm bzw. 20 mm vom Tumor entfernt) beobachtet (Abb. 3-1D).

Die Tumorentfernung zeigte bei den analysierten Genen keinen Einfluss auf die Ausprägung der Methylierung. Es ließ sich keine Tendenz einer Methylierungsabnahme mit zunehmendem Abstand erkennen.

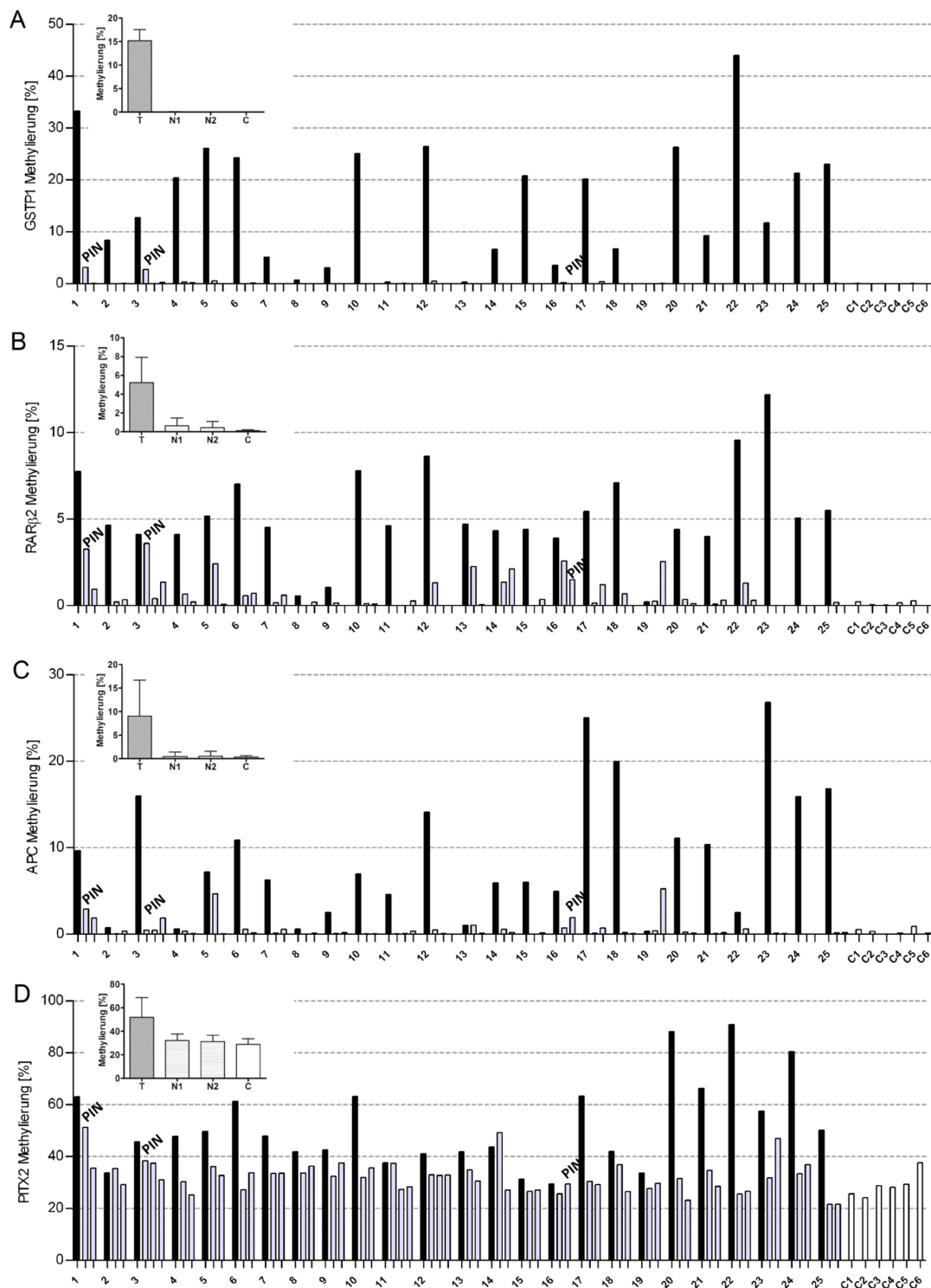


Abb. 3-1: Untersuchung des Methylierungsfeldeffektes von **(A)** GSTP1, **(B)** RAR β 2, **(C)** APC und **(D)** PITX2 in prostatistischem Tumor- und tumorangrenzenden Normalgewebe sowie komplett gesundem Gewebematerial aus BPH bzw. radikalen Zystoprostatektomien. Das zu untersuchende Gewebe wurde mit Hilfe einer Stanzapparatur aus Paraffin-eingebettetem Gewebe entnommen, daraus genomische DNA isoliert und nach Natriumbisulfit-Behandlung einer methylierungsspezifischen PCR unterzogen. Die Ermittlung der Methylierungsrate erfolgte durch Beziehen auf unmethyliertes GSTP1 (GSTP1), unmethyliertes β -Aktin (RAR β 2, APC) bzw. durch Bestimmung methylierter und unmethylierter Anteile durch Verwendung von unterschiedlich markierten Fluoreszenzsonden (PITX2). T, Tumorgewebe; N1, tumornahes Gewebe; N2, tumorfernes Gewebe; C, tumorfreies Kontrollgewebe; PIN, prostatistische intraepitheliale Neoplasie; 1-25, Patient 1-25. Kleine Balkendiagramme stellen die Mittelwerte dar, Fehlerbalken die Standardabweichung. (Modifiziert nach [183])

3.1.2 Genpromotor-Methylierung als Progressionsmarker

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Methylierungsrate und etablierten pathologischen Parametern aufzuklären, wurden die jeweiligen Methylierungsgrade der untersuchten Gene mit der Tumorausdehnung und –aggressivität in Verbindung gesetzt. Dabei ergab sich eine signifikante Assoziation der GSTP1-Methylierung mit dem pT-Stadium ($p=0,006$; Abb. 3-2A). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl die Methylierung des GSTP1 und RAR β 2 als auch APC positiv mit dem primären Gleason-Grad des Tumors assoziiert war (GSTP1: $p=0,021$; RAR β 2: $p=0,018$; APC: $p=0,021$; Abb. 3-2B). Keine signifikanten Assoziationen wurden für PITX2 ermittelt (Abb. 3-2A, Abb. 3-2B).

Zusätzlich konnten signifikante Korrelationen der GSTP1- und PITX2-Methylierung mit dem Patientenalter gefunden werden (GSTP1: ($r_s=0,424$, $p=0,035$; PITX2: $r_s=0,432$; $p=0,031$), Daten nicht gezeigt).

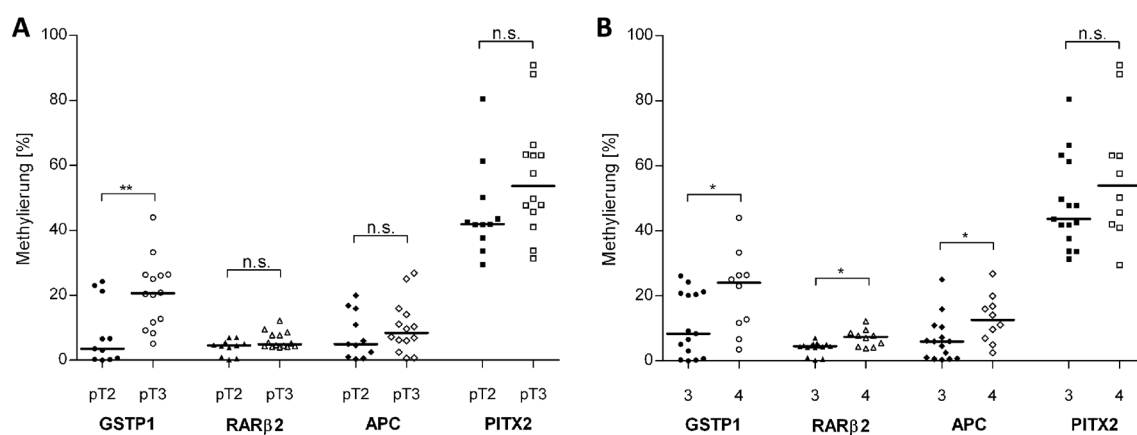


Abb. 3-2: Assoziationen der Genpromotor-Methylierung mit **(A)** pT-Stadium und **(B)** primärem Gleason-Grad (3 und 4) im prostaticen Normal- und Tumorgewebe von 25 Patienten. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; n.s., nicht signifikant (Modifiziert nach [183])

3.1.3 RAR β 2-Methylierung als möglicher Marker zur frühen Diagnose des PCa

Durch die erhöhte Methylierungsrate im tumorangrenzenden Normalgewebe konnte RAR β 2 als möglicher Kandidat zur Vorhersage eines PCa im histologisch normal erscheinenden Gewebe erkannt werden. Um seine potenzielle Eignung als molekularer Marker der Früherkennung vertiefend zu untersuchen, wurden „gepaarte“ Gewebeproben (Gewebeproben aus malignen und nicht-malignen Arealen) von weiteren 50 Patienten sowie Gewebe aus tumorfreiem Zystoprostatektomiegewebe von acht Patienten auf ihre Methylierung hin untersucht (Tab. 3-2).

Eine genaue Abstandsmessung der entnommenen Normalgewebsproben zum Tumorgewebe wurde hier nicht vorgenommen.

Tab. 3-2: Charakteristika der verwendeten Patienten (n=50) zur weiteren Analyse der RAR β 2-Promotormethylierung

Fall	Alter bei OP	präoperativer PSA-Wert [ng/ml]	pT	Gleason Score	Fall	Alter bei OP	präoperativer PSA-Wert [ng/ml]	pT	Gleason Score
1	65	5,00	T3a	3+4	26	60	5,30	T2c	4+4
2	49	6,00	T2b	3+4	27	59	14,00	T2c	3+3
3	60	11,00	T2b	3+2	28	66	7,90	T2c	3+3
4	70	2,40	T3a	3+4	29	74	5,00	T2c	3+3
5	72	7,30	T2b	3+4	30	64	3,50	T2c	3+4
6	58	9,60	T2c	4+4	31	65	20,00	T3b	4+5
7	70	14,10	T2c	3+3	32	45	3,00	T2c	3+3
8	59	6,80	T2c	3+4	33	51	9,10	T2c	3+4
9	63	6,40	T3a	3+4	34	67	6,80	T2c	3+3
10	59	4,80	T2c	n/a	35	66	4,10	T2c	3+3
11	55	n/a	T3a	3+3	36	50	11,40	T3a	3+3
12	62	6,00	T3a	3+4	37	67	6,20	T2c	3+3
13	60	19,00	T2c	3+4	38	46	7,72	T3a	3+3
14	63	6,90	T3a	3+4	39	60	6,80	T2c	3+3
15	64	5,50	T2c	3+4	40	54	4,93	T3a	3+4
16	66	6,20	T2c	3+3	41	62	n/a	T2c	3+4
17	61	5,00	T2c	3+3	42	53	5,30	T3a	4+5
18	66	26,10	T3b	3+4	43	71	4,06	T2c	3+3
19	70	8,60	T2c	3+3	44	65	8,10	T2c	3+3
20	51	3,96	T2c	3+4	45	66	4,84	T2a	3+3
21	65	1,90	T2c	3+4	46	56	8,40	T2c	3+3
22	67	20,00	T2c	3+4	47	66	6,15	T2c	3+4
23	62	3,90	T2c	3+3	48	64	14,80	T3a	3+4
24	55	5,40	T2c	3+3	49	60	18,33	T2c	3+4
25	51	15,70	T2c	3+4	50	64	9,42	T3a	3+4

Tumorfrees Kontrollgewebe zeigte keine über das Detektionslimit reichende Methylierung. Die Patienten des neuen Kollektivs wiesen in den entnommenen Tumorproben Methylierungsraten zwischen 0,1 % und 9,5 % auf, wobei drei Fälle unterhalb des durch das Kontrollgewebe vorgegebenen Grenzwertes lagen und somit als nicht erhöht bewertet wurden (Abb. 3-3A). Im tumorangrenzenden Normalgewebe konnte in 64 % aller untersuchten Fälle (32/50) eine gesteigerte Methylierungsrate, bezogen auf das Kontrollgewebe, ermittelt werden (Abb. 3-3B). Die statistische Auswertung ergab signifikante Unterschiede zwischen Kontroll-, Tumor- und tumorangrenzendem Normalgewebe (Abb. 3-3D).

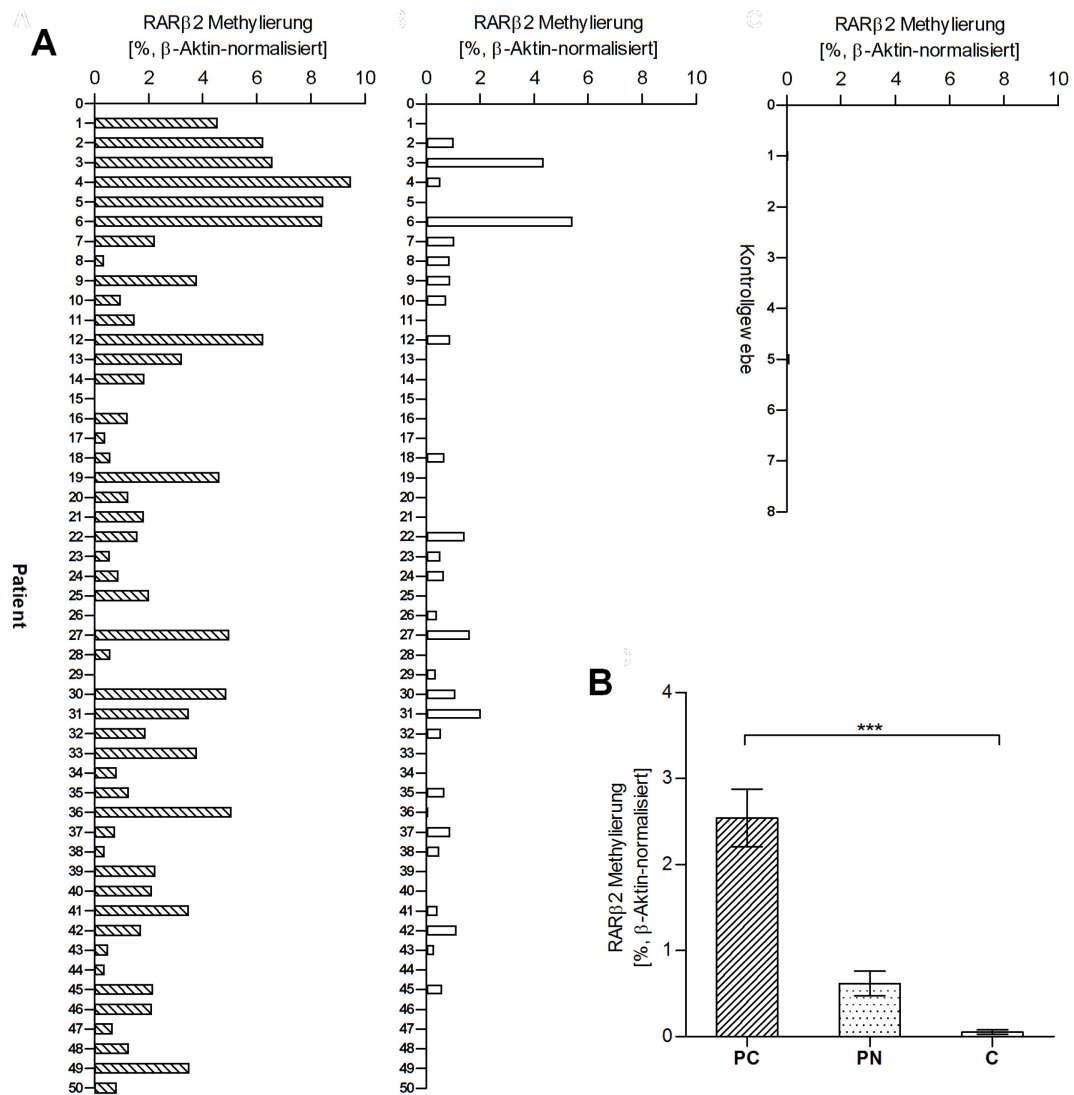


Abb. 3-3: RARβ2-Methylierung in **(A)** Tumor- (links) und korrespondierendem tumorangrenzendem Normalgewebe (Mitte) von weiteren 50 PCa-Patienten sowie komplett tumorfreiem Zystoprostatektomiegewebe (rechts), entnommen aus 8 Patienten. Nach Isolierung genomischer DNA aus entsprechenden Bereichen des archivierten Gewebes erfolgte die Behandlung mit Natriumbisulfit. In einer anschließenden PCR mit methylierungsspezifischen Primern wurde der Grad der Methylierung durch Normalisierung auf den Gesamt-DNA-Gehalt (gemessen anhand β-Aktin) bestimmt. **(D)** Darstellung der Mittelwerte \pm SEM; PC, Tumorgewebe; PN, Normalgewebe; C, Kontrollgewebe; One Way-ANOVA; ***, $p < 0,001$

Die tumorale RARβ2-Methylierung zeigte in diesem Patientenkollektiv keine Korrelation mit dem pT-Stadium (pT2 vs. pT3: $p = 0,784$; Abb. 3-4A) und bestätigt die Ergebnisse der vorherigen Studie (siehe 3.1.2). Eine eindeutige Aussage über eine mögliche Korrelation der RARβ2-Methylierung mit dem primären Gleason-Grad ließ sich aufgrund der inhomogenen Gruppenverteilung (G3 vs. G4) nicht treffen (Abb. 3-4B).

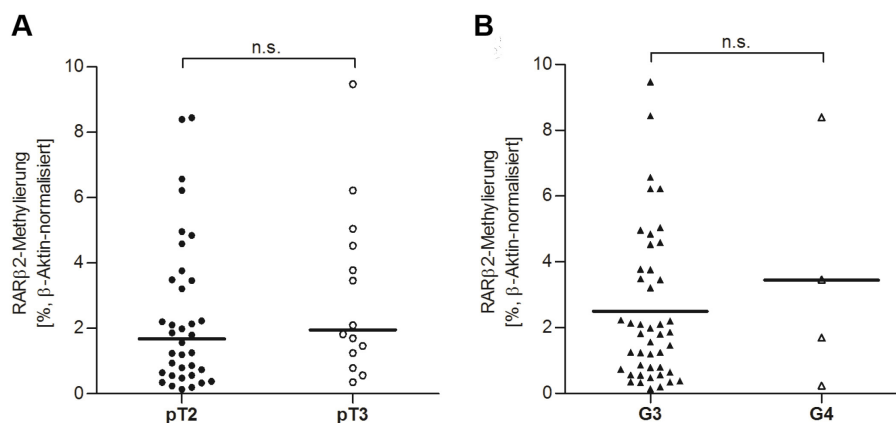


Abb. 3-4: Assoziationen der RARβ2-Methylierung mit **(A)** pT-Stadium (pT2 und pT3) bzw. **(B)** primärem Gleason-Grad (3 und 4) des neuen Patientenkollektivs (n=50). G; primärer Gleason-Grad; n.s., nicht signifikant

3.1.4 MethylProfiler-Screening zur Ermittlung methylierter Gene im Prostatakarzinom

Anhand der in Abschnitt 3.1.1 ermittelten Ergebnisse zum Methylierungsfeldeffekt im prostatistischen Gewebe konnten bereits vier Gene mit differenziellen Methylierungsmustern in Normal- und Tumorgewebeproben erkannt werden. Um weitere mögliche Gene zu identifizieren, die durch ihre Promotormethylierung als mögliche Biomarker zur Detektion des Prostatakarzinoms im morphologisch normal erscheinenden Gewebe in Frage kommen könnten, wurde ein weiteres Screening-Verfahren im Array-Format angewandt. An isolierter genomischer DNA aus gepaarten archivierten Tumor- und tumorangrenzenden Normalgewebeproben von 5 ausgewählten PCa-Patienten (Tab. 3-3) erfolgte mittels des kommerziell erhältlichen MethylProfiler-Arrays (Applied Biosciences) ein Profiling von 24 Genen, die in Tab. 3-4 aufgelistet sind.

Tab. 3-3: Charakteristika der analysierten Patienten (n=5) für die MethylProfiler-Studie. PSA, Prostata-spezifisches Antigen

Patient	Alter	PSA [ng/ml]	Pathologische Daten des PCa	
			Gleason Score	pT-Stadium
1	73	9,92	4+3	2c
2	65	10,6	3+4	2c
3	61	6,09	4+3	3a
4	73	6,3	3+4	3a
5	67	4,84	3+3	2a

Anders als bei der Natriumbisulfit-Behandlung zur Unterscheidbarkeit methylierter und unmethylierter DNA-Bereiche wurden bei dieser Methode methylierungsspezifische

Restriktionsenzyme eingesetzt. Durch die Behandlung der Proben mit den verschiedenen Restriktionsenzymen (zur Funktionsweise des Assays siehe 2.2.2.6.5) konnte der Anteil an hyper- und unmethylierter DNA bzw. intermediär methylierter Promotorregionen (Input-DNA minus dem Anteil hochmethylierter DNA und unmethylierter DNA = intermediäre Methylierung) in einem qPCR-Lauf für alle untersuchten Gewebeproben ermittelt werden.

Tab. 3-4: Übersicht der Gene, die anhand der MethylProfiler-Studie auf ihren Methylierungsstatus untersucht wurden

Symbol	Name	Referenzsequenz
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>	NM_000038
AR	<i>Androgen receptor</i>	NM_000044
CAV1	<i>Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa</i>	NM_001753
CCNA1	<i>Cyclin A1</i>	NM_003914
CDH1	<i>Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)</i>	NM_004360
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)</i>	NM_000077
DKK3	<i>Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)</i>	NM_015881
DLC1	<i>Deleted in liver cancer 1</i>	NM_006094
EDNRB	<i>Endothelin receptor type B</i>	NM_003991
GPX3	<i>Glutathione peroxidase 3 (plasma)</i>	NM_002084
GSTP1	<i>Glutathione S-transferase pi 1</i>	NM_000852
hsa-mir-34a	N/A	MI0000268
MGMT	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>	NM_002412
MSX1	<i>Msh homeobox 1</i>	NM_002448
OPCML	<i>Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like</i>	NM_002545
PDLIM4	<i>PDZ and LIM domain 4</i>	NM_003687
PTGS2	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)</i>	NM_000963
RARB	<i>Retinoic acid receptor, beta</i>	NM_000965
RASSF1	<i>Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1</i>	NM_007182
SFRP1	<i>Secreted frizzled-related protein 1</i>	NM_003012
SLC5A8	<i>Solute carrier family 5 (iodide transporter), member 8</i>	NM_145913
TIMP2	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 2</i>	NM_003255
TNFRSF10D	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain</i>	NM_003840
ZNF185	<i>Zinc finger protein 185 (LIM domain)</i>	NM_007150

Anhand des Programmes Genesis (<http://genome.tugraz.at/>) wurde eine Heatmap erstellt, die die jeweilige Summe aus hochmethylierter und intermediärer Methylierung zeigt. Hier sind Unterschiede in der prozentualen Hypermethylierung in Tumor- und tumorangrenzenden Normalgewebsbereichen der untersuchten Patienten deutlich sichtbar (Abb. 3-5A). Hochmethylierte Bereiche konnten vor allem in den untersuchten Promotorregionen der Gene APC, GPX3, GSTP1, MSX1, RAR β 2, RASSF1 und ZNF185 nachgewiesen werden, die im Tumor einen prozentualen Anteil zwischen 50 und 95% ausmachten (Abb. 3-5B). Mit Ausnahme von ZNF185, wiesen dabei die bestimmbar tumorangrenzenden Normalgewebeproben jeweils eine geringere, aber erkennbare Methylierung auf (Abb. 3-5B, C).

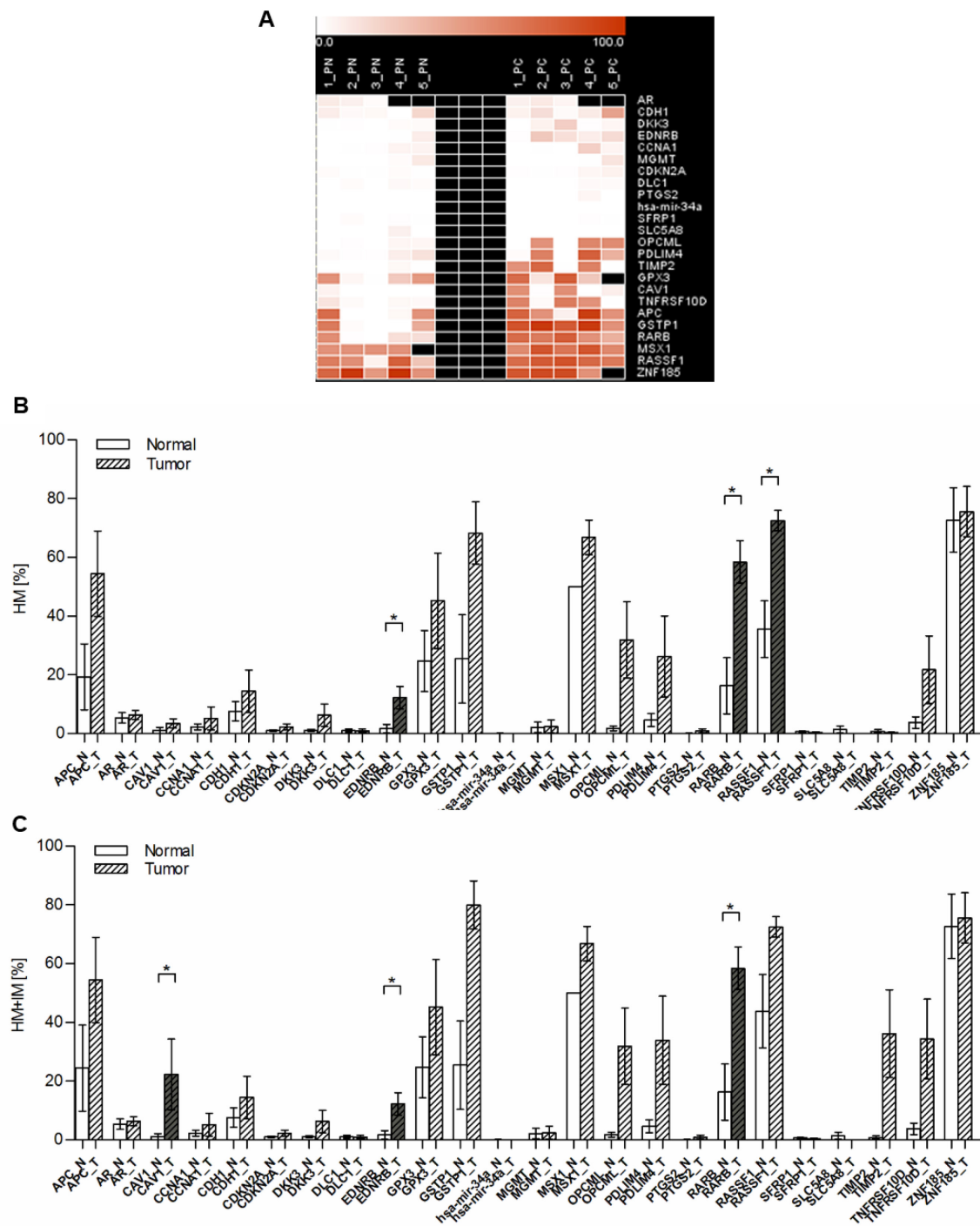


Abb. 3-5: MethylProfiler-Studie zur Ermittlung veränderter Methylierungsraten von 24 Genen im prostatistischem Gewebe. **(A)** Heatmap (durch das Programm Genesis generiert) zur Übersicht der Hypermethylierung in prostatistischem Tumor- und tumorangrenzenden Normalgewebeproben von 5 Patienten nach Summierung intermediärer und hochmethylierter Anteile. Schwarze Kästchen = nicht bestimmbar. **(B)** Mittelwerte der hochmethylierten Anteile aus 5 Patienten (Normal- und Tumorgewebe). **(C)** Mittelwerte der Summen aus starker und intermediärer Methylierung. Dargestellt ist die jeweilige prozentuale Methylierung in Tumor- bzw. korrespondierendem tumorangrenzenden Normalgewebe von 5 Patienten im Vergleich. Hyper- und Intermediärmethylierung wurden dabei addiert. weiße Balken = Normalgewebe, graue Balken = Tumorgewebe, dunkelgraue Balken = Methylierung im Tumor signifikant erhöht. 1-5, Patient 1 bis 5; HM, Hohe Methylierung; IM, intermediäre Methylierung; *, $p < 0,05$.

Signifikante Unterschiede in den Methylierungsraten von Tumor- und tumorangrenzendem Normalgewebe konnten für die Gene EDNRB (PN: 1,6 %, PC: 11 %), RASSF1 (PN: 15 %, PC: 50 %) und RAR β 2 (PN: 30 %, PC: 62 %) ermittelt werden (Abb. 3-5B). Obwohl nicht signifikant unterschiedlich, zeigten besonders die Gene APC und GSTP1 verstärkt hochmethylierte Anteile im Tumorgewebe. Der Methylierungsgrad für GSTP1 lag hier durchschnittlich bei rund 80 % und war zudem in zwei korrespondierenden Normalgewebeproben nachweisbar (Abb. 3-5A, B).

Jeweils drei der fünf analysierten Fälle zeigten im Tumor eine erhöhte Methylierung in den Genen OPCML und PDLIM4, deren Modifizierung im Normalgewebe kaum vorhanden bzw. niedriger lag (Abb. 3-5A).

Während eine epigenetische Modifizierung durch Methylierung für die microRNA miR-34a nicht nachgewiesen wurde, konnte bei Summierung von hochmethylierten und partiell methylierten Anteilen eine signifikant erhöhte Methylierung des CAV1-Promotors im kanzerogenen Gewebe identifiziert werden (PN: 1,3 %, PC: 23 %; Abb. 3-5C). Ähnliche Tendenzen konnten beim TIMP2-Gen erkannt werden (PN: 1,0 %; PC: 39 %; Abb. 3-5C).

Sehr schwache Methylierungsraten ergaben sich in den untersuchten Patienten für AR, CCNA1 und DKK3. Die Gene CDKN2A, MGMT, PTGS2, SFRP1 und SLC5A8 wiesen nur minimale Methylierungsraten auf und sind daher eher als nicht methyliert zu betrachten.

3.2 Untersuchungen zur Angiogenese als Marker des Prostatakarzinoms

Neben den Untersuchungen zur Hypermethylierung beim Prostatakarzinom stellten die Expressionsanalysen angiogenetischer und Endothel-assoziiierter Faktoren einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Die Ergebnisse hierzu werden im folgenden Kapitel beschrieben.

3.2.1 Charakteristika des verwendeten Patientenkollektivs

Das für die Genexpressionsanalyse zu analysierende Patientenkollektiv umfasste gepaartes Normal- und Tumorfriischgewebe von 69 Patienten, welches nach radikaler Prostatektomie aus dem Operationspräparat in den Jahren 2001 und 2008 entnommen worden war. Eine Gewebeprobe wurde als Tumorgewebe definiert, wenn mindestens 90 % des Materials tumorale Zellen entsprachen. Angaben zu den Patientendaten und pathologischen Befunden sind in Tab. 3-5 ersichtlich.

Tab. 3-5: Charakteristika des verwendeten Patientenkollektivs sowie zugehörige pathologische Klassifizierung.
[†]Postoperativer Wiederanstieg des PSA >0,1 µg/l

	Anzahl [%]		Anzahl [%]
Gesamt	69	Metastasierungsstatus	
Alter (Jahre)		M0/Mx	68 (98,6)
Median	62	M1	1 (1,4)
Bereich	45-74	Schnitttrandstatus	
Präoperativer PSA-Wert (µg/l)		R0	44 (63,8)
Median	6,7	R1	24 (34,8)
Bereich	1,24-25,8	Rx	1 (1,4)
Tumoreigenschaften		Gleason Score	
pT-Stadium		<7	25 (36,2)
pT2a	1 (1,4)	=7	30 (43,5)
pT2b	3 (4,3)	>7	14 (20,3)
pT2c	42 (60,9)	Follow-Up (Monate)	
pT3a	19 (27,5)	Median	35,65
pT3b	4 (5,8)	Bereich	2-85
Lymphknotenstatus		Patienten mit biochemischem Rezidiv [†]	13
pN0/Nx	68 (98,6)		
pN1	1 (1,4)		

3.2.2 Genexpression Endothel-assoziiierter Faktoren im prostatistischen Gewebe

Da die Bestimmung der Mikrogefäßdichte auf immunhistochemischer Ebene sehr zeitaufwendig ist und stark von der auswertenden Person abhängt, sollte die Angiogenese anhand der Expression verschiedener ausgesuchter Endothel-assoziiierter Faktoren zunächst auf mRNA-Ebene

ermittelt werden. Dazu wurden die Expressionen der Oberflächenmoleküle CD31, CD34, CD105, CD144 und CD146, des Wachstumsfaktors VEGFA und dessen Rezeptor VEGFR2 sowie das in endothelialen Zellen vorkommende Strukturprotein CAV1 mittels der RT-qPCR-Methodik untersucht.

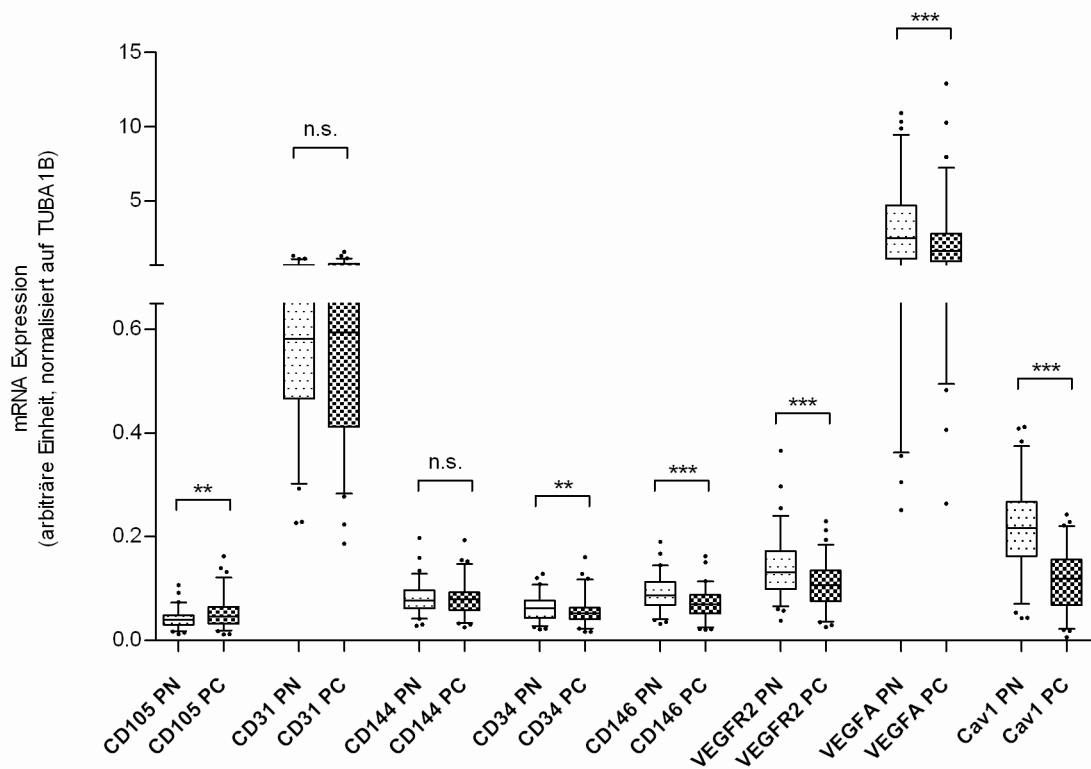


Abb. 3-6: mRNA-Expression endothelialer Faktoren im gepaarten prostaticen Normal- und Tumorgewebe (n=69). Nach Isolation von Gesamt-RNA und anschließender cDNA-Synthese erfolgte die Bestimmung der mRNA-Expression anhand der RT-qPCR. TUBA1B diente als Referenzgen zur Normalisierung der Expressionsdaten. Box-Plot mit Median. Whiskers repräsentieren 5- und 95-Perzentile. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; n.s., nicht signifikant

Allen Patienten wurde aufgrund des Vorhandenseins eines Karzinoms die Prostata durch radikale Prostatektomie operativ entfernt und Gewebeproben in flüssigem Stickstoff archiviert. Anhand von Kryoschnitten erfolgte eine genaue pathologische Verifizierung von Normal- und Tumorearealen im Gewebe, aus denen mittels einer Stanzapparatur Gewebezylinder entnommen und zur Total-RNA-Isolierung überführt wurden. Somit konnte von jedem Patienten Normal- als auch Tumorgewebe im Vergleich analysiert werden. Die Total-RNA aller isolierten Gewebeproben zeigte einen Qualitätswert von $RIN > 6$. Bei Analyse der drei für die Prostata in Frage kommenden Referenzgene ALAS1, HPRT1 und TUBA1B [184] erwies sich letzteres in dieser Studie als bestes

Referenzgen zur Normalisierung der Expressionen, da dessen Expression zwischen Tumor- und tumorassoziiertem Normalgewebsproben keine signifikanten Unterschiede zeigte.

Die RT-qPCR-Analyse ergab deutliche Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen endothelialen Faktoren (Abb. 3-6). So ist besonders VEGFA in hoher Konzentration nachweisbar. Darüber hinaus zeigte CD31 sowohl im Tumor- als auch im tumorangrenzenden Normalgewebe die höchste mRNA-Menge aller untersuchten CD-Moleküle (Abb. 3-6).

Bei Vergleich der jeweiligen Expressionen in Normal- und Tumorgewebe untereinander wurden für 6 der 8 untersuchten endothelialen Faktoren Unterschiede nachgewiesen. Zur Veranschaulichung der Expressionänderungen wurden Fold Changes kalkuliert, die in Tab. 3-6 zusammengefasst sind. Hierbei zeigten die Faktoren CD31 und CD144 zwischen Tumor- und tumorangrenzendem Normalgewebe keine signifikanten Änderungen in ihren RNA-Expressionen (Fold Change (CD31)=1,06, $p=0,781$; Fold Change (CD144)=1,02, $p=0,706$). Endoglin (CD105) erschien im Tumor signifikant um das 1,15-fache erhöht ($p=0,006$), wohingegen CD34 im Tumor um das -1,17-fache im Tumor erniedrigt vorlag ($p=0,008$). CD146, VEGFR2 und VEGFA zeigten im Tumorgewebe eine Herunterregulierung um -1,25 ($p<0,0001$), -1,27 ($p<0,0001$) bzw. -1,40 ($p<0,0001$). Ein wesentlicher Expressionsunterschied ließ sich bei CAV1 feststellen, welches im Tumor bei Vergleich mit prostatistischem Normalgewebe -1,89-fach geringer exprimiert wurde als im tumorangrenzenden Normalgewebe (Tab. 3-6).

Tab. 3-6: Relative Expressionsunterschiede Endothel-assoziiierter Faktoren zwischen Tumor- und tumorangrenzenden Normalbereichen im prostatistischem Gewebe von 69 Patienten nach radikaler Prostatektomie. Relative Expressionsunterschiede sind angegeben als Median der Fold Changes (Tumor/Normal) des untersuchten Patientenkollektives. [†]Wilcoxon-Test

Faktor	Fold Changes	p [†]
Normal vs. Tumor		
CD105	1,15	0,006
CD31	1,06	0,781
CD144	1,02	0,706
CD34	-1,17	0,008
CD146	-1,25	<0,0001
VEGFR2	-1,27	<0,0001
VEGFA	-1,40	<0,0001
CAV1	-1,89	<0,0001

Anhand der in Tab. 3-7 ersichtlichen Spearman-Korrelationsmatrix lassen sich enge Zusammenhänge zwischen den Expressionen der einzelnen endothelialen Faktoren erkennen. Keine signifikanten Korrelationen ergaben sich für CD105 mit CD146 ($r_s=0,126$; $p=0,301$) bzw. CAV1 ($r_s=-0,184$; $p=0,129$) und CD31 mit CD146 ($r_s=0,219$; $p=0,071$) bzw. CAV1 ($r_s=0,124$; $p=0,312$). Alle

weiteren Faktorkombinationen wiesen signifikante Korrelationskoeffizienten zwischen 0,305 (CAV1 vs. CD144) und 0,810 (CD34 vs. CD144) auf.

Tab. 3-7: Spearman-Korrelationsmatrix der Expressionen Endothel-assoziiierter Faktoren. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

Faktor	CD105	CD144	CD31	CD34	CD146	VEGFR2	CAV1
CD105	-	0,556***	0,547***	0,446***	0,126	0,332*	-0,184
CD144	0,556***	-	0,724***	0,810***	0,534***	0,676***	0,305*
CD31	0,547***	0,724***	-	0,642***	0,219	0,395**	0,124
CD34	0,446***	0,810***	0,642***	-	0,456***	0,671***	0,370**
CD146	0,126	0,534***	0,219	0,456***	-	0,579***	0,746***
VEGFR2	0,332*	0,676***	0,395**	0,671***	0,579***	-	0,401**
CAV1	-0,184	0,305*	0,124	0,370**	0,746***	0,401**	-

3.2.3 RNA-Expression und pathologische Parameter

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Genexpressionen der untersuchten endothelialen Faktoren mit routinemäßig etablierten pathologischen Parametern zu erkennen, wurden die Patienten anhand des pT-Stadiums bzw. Gleason Scores des Tumors in Gruppen eingeteilt. Hierbei wurden Patienten nach der Tumorausdehnung (organbegrenzt (pT2) vs. organüberschreitend (pT3)) bzw. dem Grading (Gleason Score <7 vs. =7 vs. >7) unterteilt und mit den ermittelten tumoralen RNA-Expressionsdaten assoziiert.

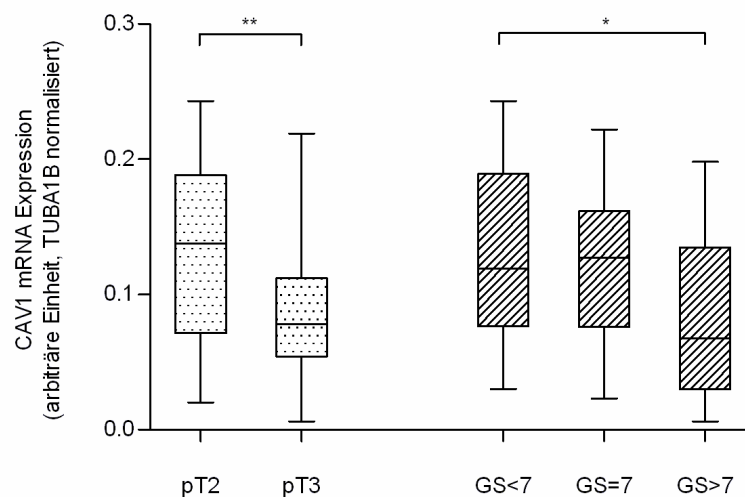


Abb. 3-7: Die CAV1-mRNA-Expression assoziiert invers mit Tumorausdehnung und -Grading im prostatistischen Gewebe. Nach Einteilung der untersuchten 69 Patienten anhand ihres pT-Stadiums und Gleason Scores wurden die Gruppen mittels des Mann-Whitney-U-Tests (pT2 vs. pT3) bzw. Kruskal-Wallis-Tests (GS<7 vs. GS=7 vs. GS>7) verglichen. Box-Plot mit Median und Interquartilabstand. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

Während annähernd alle untersuchten Faktoren keine Assoziationen mit pathologischen Merkmalen zeigten, konnte für CAV1 eine signifikante inverse Assoziation mit pT-Stadium ($p=0,006$) bzw. Gleason Score ($p=0,032$) ermittelt werden (Abb. 3-7). Demnach nahm die CAV1-mRNA-Expression im untersuchten Patientenkollektiv mit zunehmender Tumorausdehnung ($p=0,006$) und –Grading ($p=0,032$) signifikant ab.

3.2.4 Diagnostisches Potenzial Endothel-assoziiierter Faktoren

Um die Frage zu klären, wie gut die mRNA-Expressionen Endothel-assoziiierter Faktoren zwischen Normal- und Tumorgewebe zu unterscheiden vermögen, wurden Receiver Operating Characteristic (ROC)-Analysen für jeden untersuchten endothelialen Faktor erstellt. Durch die Auftragung der ermittelten Sensitivität gegen 1-Spezifität konnten die jeweiligen Fläche unter der resultierenden Kurve (AUC) ermittelt werden.

Tab. 3-8: Ergebnisse der Receiver Operating Characteristic (ROC)-Analyse aller untersuchten Endothel-assoziierten Faktoren zur Bewertung der Diskriminierung von Tumor- und tumorangrenzendem Prostatagewebe ($n=69$)

Faktor	AUC	95%-Konfidenzintervall	p
CD31	0,509	0,412-0,606	0,853
CD144	0,521	0,424-0,617	0,675
CD105	0,604	0,508-0,699	0,035
CD34	0,605	0,508-0,699	0,035
VEGFA	0,627	0,533-0,721	0,01
VEGFR2	0,665	0,575-0,755	0,0008
CD146	0,680	0,592-0,769	0,0002
CAV1	0,837	0,772-0,903	<0,0001

Während sich die AUC-Werte bei annähernd allen Faktoren zwischen 0,509 und 0,680 bewegten (Tab. 3-8), konnte für CAV1 eine gute Trennung von Normal- und Tumorgewebe anhand einer AUC von 0,837 ermittelt werden (Tab. 3-8, Abb. 3-8).

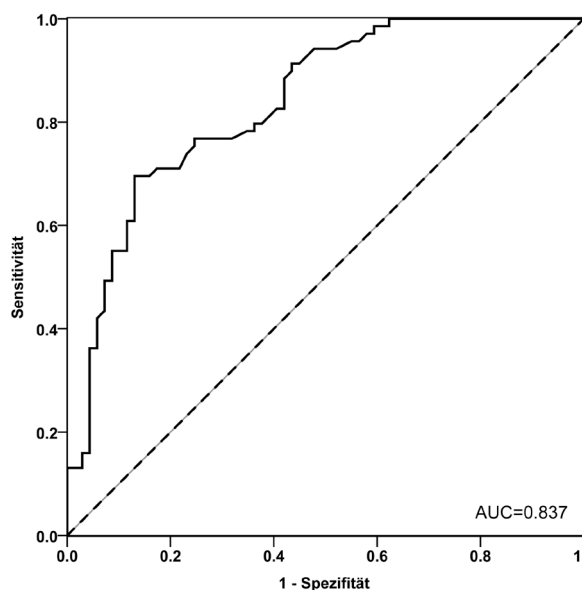


Abb. 3-8: Receiver Operating Characteristic (ROC)-Analyse zur Ermittlung der diagnostischen Aussagekraft der CAV1-mRNA-Expression im prostatistischen Normal- und Tumorgewebe von 69 Patienten. Die CAV1-mRNA-Expression zeigt eine gute Trennung zwischen den gepaarten Proben. AUC, area under the curve

3.2.5 Überlebensanalyse zur Abschätzung der prognostischen Relevanz

Zur Abschätzung der prognostischen Aussagekraft der tumoralen mRNA-Expression endothelialer Faktoren wurden univariate Kaplan-Meier-Überlebensanalysen zu Rate gezogen. Alle in dieser Studie eingeschlossenen Patienten wurden in den Jahren 2001 bis 2008 prostatektomiert und die Verfolgung des post-operativen Krankheitsverlaufes betrug 7 Jahre. Ein Rezidiv nach radikaler Prostatektomie lag vor, wenn nach postoperativem Absinken des PSA-Wertes unter das Detektionslimit ($<0,04 \mu\text{g/l}$) ein Wiederanstieg von $>0,1 \text{ ng/ml}$ zu verzeichnen war. Im Verlauf der Nachsorgeuntersuchungen zeigten 13 der untersuchten 69 Patienten einen postoperativen Wiederanstieg des Serum-PSA. Durch Dichotomisierung der Expressionsdaten nach dem Median wurden zwei Gruppen generiert, die in der Überlebensanalyse miteinander durch Verwendung des Log Rang-Testes verglichen wurden.

Während fast alle untersuchten endothelialen Faktoren keine prognostische Relevanz besaßen (Log Rang: $p=0,353$ (CD31); $p=0,303$ (CD34); $p=0,131$ (CD105); $p=0,433$ (CD144); $p=0,112$ (CD146); $p=0,171$ (VEGFR2)), konnte für CAV1 ein signifikanter Unterschied zwischen den nach dem Median getrennten Gruppen nachgewiesen werden (Log Rang: $p=0,019$; Abb. 3-9). Patienten mit niedrigerer CAV1-mRNA-Expression als der Median zeigten besonders in den ersten 20 Monaten eine deutlich schlechtere Prognose im Krankheitsverlauf im Vergleich zu Patienten mit höherer CAV1-mRNA-Expression.

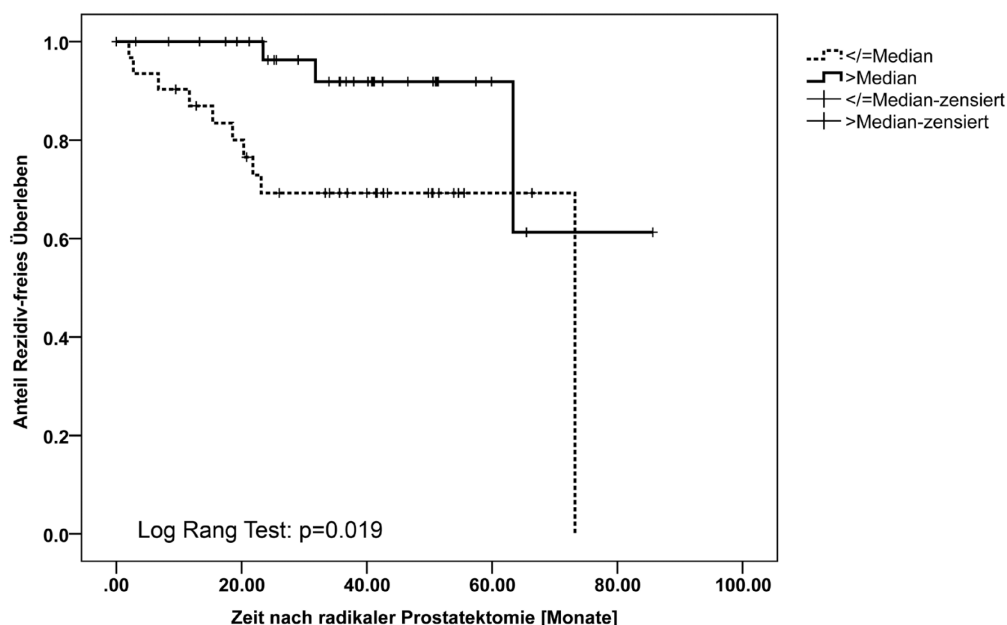


Abb. 3-9: Signifikant schlechteres Überleben bei Patienten mit geringer CAV1-mRNA-Expression. Univariate Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Bestimmung der prognostischen Relevanz der CAV1-mRNA-Expression beim Prostatakarzinom. Zur Einteilung der CAV1-mRNA-Expression in zwei Gruppen wurde eine Dichotomisierung der Daten anhand des Medians durchgeführt.

Neben der univariaten Kaplan-Meier-Analyse wurde zudem eine Cox-Regression als multivariates Statistikverfahren angewendet. Nach Einbeziehen von pT-Stadium und Gleason Score erwies sich die CAV1-mRNA-Expression als kein unabhängiger prognostischer Marker im untersuchten Patientenkollektiv (Daten nicht gezeigt).

3.2.6 Ermittlung der intratumoralen Mikrogefäßdichte im prostatischen Gewebe

Die Mikrogefäßdichte ist ein Maß zur Bestimmung der Angiogenese. Grundlage der immunhistochemischen Untersuchung von Mikrogefäßdichten ist die Markierung Endothel-assoziiierter Faktoren, die die Gefäßstrukturen sichtbar machen.

Inwieweit die Mikrogefäßdichte als Maß der Angiogenese im Prostatakarzinom als Progressionsmarker im untersuchten Patientenkollektiv eine Rolle spielt, wurde immunhistochemisch durch Anfärbung und Auszählung der Mikrogefäße untersucht. Von den 69 Fällen, die in der RNA-Expressionsanalyse bereits analysiert wurden, konnte von 64 Patienten auch archiviertes, in Paraffin eingebettetes Gewebematerial zur Tissue-Microarray (TMA)-Herstellung herangezogen werden. Tumorareale aller Gewebelöcke wurden zunächst genauestens durch H&E-Färbung pathologisch identifiziert. Aus den jeweiligen verifizierten Tumorbereichen konnte von allen Gewebelöcken jeweils eine repräsentative Gewebestanz (\emptyset

1,5 mm) zum Aufbau des TMA entnommen werden. Durch immunhistochemische CD31- bzw. CD34-Färbung wurden die Mikrogefäße visualisiert.

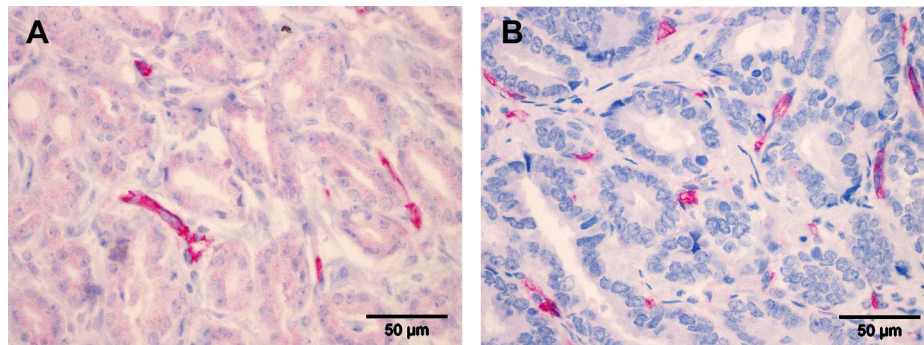


Abb. 3-10: Visualisierung der Mikrogefäße im prostatistischen Gewebe durch Verwendung eines monoklonalen **(A)** CD31- bzw. **(B)** CD34-Antikörpers. Deutlich erkennbar sind die rot markierten endothelialen Strukturen im prostatistischen Tumorgewebe. (Vergrößerung: 400x)

Nach der Färbeprozedur konnten 46-48 Gewebe-Spots zur Auswertung herangezogen werden (Tab. 3-9).

Tab. 3-9: Ausprägung der MVD im untersuchten Prostatakarzinomgewebe im TMA-Format

	CD31	CD34	CAV1
auswertbare Spots	49/64	48/64	46/64
MVD (Gefäße/mm²)			
Median	57,4 (0-275,4)	123,7 (10,2-369,8)	19,1 (0-119,9)

Nach Auszählung der Mikrogefäße konnte eine deutliche Korrelation zwischen CD31- und CD34-bestimmter MVD nachgewiesen werden ($r_s=0,603$, $p<0,0001$; Abb. 3-11A). Die MVD-Ermittlung anhand CD34-Markierung zeigte zudem aufgrund der zusätzlichen Markierung von endothelialen Vorläuferzellen eine deutlich bessere Auswertbarkeit (Beispielfärbung siehe Abb. 3-10).

Des Weiteren wurde die Anzahl CAV1-positiver Mikrogefäße (entsprechend der Auswertung mittels CD31 und CD34) mit der herkömmlich bestimmten MVD korreliert. Eine Tendenz zur positiven Korrelation zur CD31-bestimmten MVD konnte festgestellt werden ($r_s(\text{CD31-MVD vs. CAV1-MVD})=0,271$, $p=0,075$; Abb. 3-11A). Keine Korrelation der CAV1-MVD ergab sich bei Verwendung der mittels CD34 bestimmten MVD ($r_s=0,108$, $p=0,475$; Abb. 3-11B).

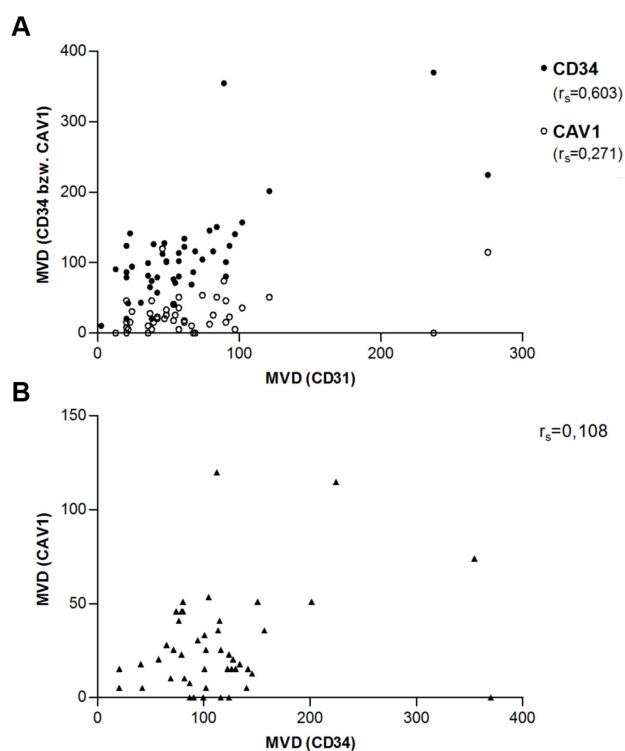


Abb. 3-11: Bestimmung der Mikrogefäßdichte anhand der Faktoren CD31, CD34 und CAV1 und ihre Korrelation. **(A)** Die über CD31-Markierung bestimmte MVD korreliert signifikant mit der über CD34-Markierung ermittelten MVD, jedoch nicht mit der über CAV1 ermittelten MVD. **(B)** CD34-MVD korreliert nicht mit der über CAV1 bestimmten MVD. MVD, Mikrogefäßdichte (Gefäße/mm²); r_s , Spearman-Korrelationskoeffizient.

Bei Kombination der immunhistochemischen MVD-Ergebnisse mit etablierten pathologischen Parametern konnten signifikante Assoziationen mit Tumorausdehnung und –Grading ermittelt werden. Die Anzahl der Mikrogefäße im Tumorgewebe stieg mit zunehmender Tumorausdehnung (pT2 vs. pT3: $p=0,093$ (CD31) bzw. $p=0,017$ (CD34) und dem Gleason Score (<7 vs. =7 vs. >7: $p<0,0001$ (CD31) bzw. $p=0,004$ (CD34)). Die Menge der CAV1-markierten Mikrogefäße zeigte jedoch keine Abhängigkeit vom Tumorstadium und -grad ($p(pT2 \text{ vs. } pT3)=0,755$; $p(GS<7 \text{ vs. } =7 \text{ vs. } >7)=0,645$). Die Verteilung der Mikrogefäßdichte in den jeweiligen Gruppen ist anhand der Mediane in Tab. 3-10 veranschaulicht.

Tab. 3-10: Übersicht zur MVD-Auswertung mittels CD31, CD34 bzw. CAV1 am TMA

	CD31-MVD (Median)	p
pT2 vs. pT3	45,9 vs. 64,4	0,093
Gleason Score (<7 vs. =7 vs. >7)	38,2 vs. 57,4 vs. 90,5	<0,0001
CD34-MVD (Median)		
pT2 vs. pT3	92,4 vs. 118,6	0,017
Gleason Score (<7 vs. =7 vs. >7)	86,7 vs. 116,0 vs. 147,9	0,004
CAV1-MVD (Median)		
pT2 vs. pT3	21,7 vs. 16,6	0,755
Gleason Score (<7 vs. =7 vs. >7)	15,3 vs. 25,5 vs. 34,4	0,645

3.2.7 Immunhistochemische Ermittlung der VEGFA-Expression

Der von Tumorzellen sezernierte vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGFA ist zur Induzierung der Angiogenese essenziell. Der Faktor wirkt stimulierend auf endotheliale Zellen des Blutgefäßsystems und durch seine Interaktion mit dem VEGFA-Rezeptor VEGFR2 wird die Kaskade zur Neubildung von Blutgefäßen angeschaltet [158].

Um zu untersuchen, wie sich die VEGFA-Proteinexpression in den Tumoren im Patientenkollektiv verhält, wurden TMA-Gewebeschnitte mit einem etablierten VEGFA-Antikörper behandelt und die epitheliale zytoplasmatische Expression der Tumorzellen in den einzelnen Gewebe-Spots anhand der Stärke der Färbung beurteilt (0=nicht vorhanden, 1=schwache Proteinexpression, 2=mittlere Proteinexpression, 3=starke Proteinexpression). Beispielfärbungen sind zur Veranschaulichung in Abb. 3-12 dargestellt.

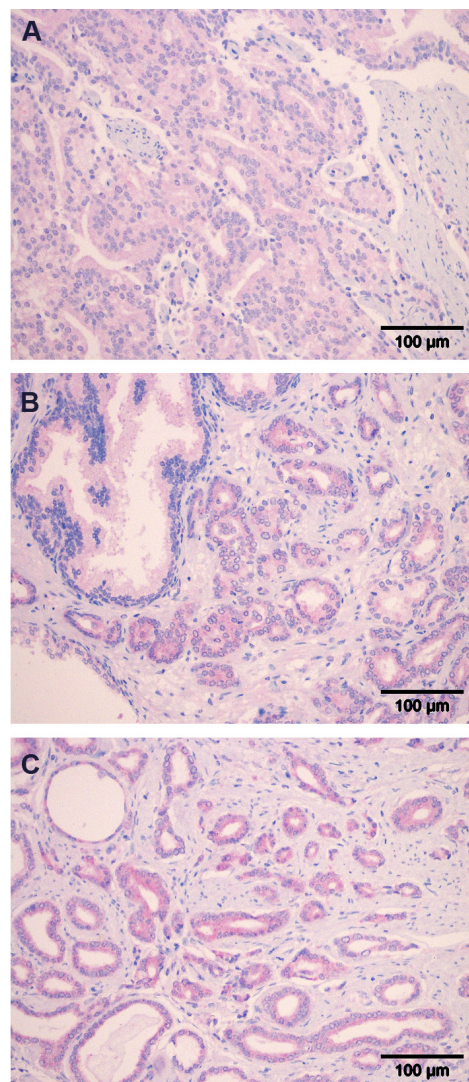


Abb. 3-12: Einteilung der epithelialen VEGFA-Proteinexpression anhand repräsentativer PCa-Bereiche mit (A) schwacher, (B) mittlerer sowie (C) starker epithelialer Proteinexpression. (Vergrößerung: 200x)

Die immunhistochemisch ermittelte VEGFA-Expression wurde mit der Mikrogefäßdichte korreliert, um Zusammenhänge zwischen den angiogenetischen Merkmalen abschätzen zu können. Dabei wurde eine positive Korrelation der VEGFA-Proteinexpression sowohl mit CD31-ermittelter MVD ($r_s=0,484$, $p<0,0001$) als auch mit der anhand von CD34 bestimmten MVD ($r_s=0,344$, $p=0,017$) beobachtet. Des Weiteren zeigte VEGFA im untersuchten Patientenkollektiv keine signifikanten Korrelationen mit pathologischen Parametern.

3.2.8 Korrelation der immunhistochemischen MVD mit der mRNA-Expression

Die immunhistochemisch bestimmte Mikrogefäßauszählung ist sehr zeitintensiv und stellt aufgrund der personenabhängigen Auswertung eine mit Fehlern behaftete Bestimmungsmethode dar. Daher ist es nötig, neue Methoden zur Angiogenese-Ermittlung in Betracht zu ziehen. Eine Möglichkeit könnte die Bestimmung der Angiogenese anhand der mRNA-Expression Endothel-assoziiierter Faktoren sein, wodurch ein robustes und reproduzierbares Verfahren mittels der RT-qPCR gewährleistet wäre. Die tumoralen mRNA-Expressionsdaten der untersuchten Endothel-assoziierten Faktoren wurden daher mit der immunhistochemisch bestimmten MVD korreliert.

Annähernd alle untersuchten endothelialen Faktoren wiesen keine Korrelationen mit der MVD auf. Die CAV1-mRNA-Expression tendierte jedoch zur inversen Korrelation mit der CD31-MVD ($r_s=-0,277$, $p=0,054$) als auch CD34-MVD ($r_s=-0,277$, $p=0,056$).

Des Weiteren zeigte die CD31-mRNA-Expression eine Tendenz zur positiven Assoziation mit der immunhistochemisch über die CD31-Markierung ermittelten Mikrogefäßdichte (Einteilung der Expression bzw. MVD anhand des Mittelwertes in zwei Gruppen, Chi-Quadrat Test: $p=0,074$).

3.2.9 Immunhistochemische Analyse von CAV1 auf Großflächenschnitten

Da CAV1 von allen untersuchten Endothel-assoziierten Faktoren den stärksten Genexpressionsunterschied zwischen Tumor- und tumorangrenzendem Normalgewebe aufwies (siehe 3.2.2), wurde die Distribution des Proteins im prostatistischen Gewebe vertiefend untersucht.

Zwar konnte anhand der TMA-Analyse die Anzahl der CAV1-positiven Mikrogefäße bestimmt werden, jedoch ließen sich weitere Aussagen über eventuelle Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und tumorangrenzendem Normalgewebe nicht treffen. Zusätzlich wurden daher von allen vorhandenen 64 Fällen Großflächenschnitte angefertigt, um einen Überblick über die Verteilung des CAV1 in gesunden sowie tumorösen Bereichen zu bekommen.

Wie bereits auch im TMA zu erkennen war, konnte keine zytoplasmatische Expression des Proteins in den epithelialen Drüsenzellen der Prostata beobachtet werden. Die Lokalisierung von CAV1 erstreckte sich auf stromale Bereiche sowie die im Stroma befindlichen Endothelzellen. Im tumorösen Stroma von 12 Fällen zeigte sich zudem eine deutliche Verminderung im CAV1-Expressionsmuster bei Vergleich zu korrespondierenden Regionen des histologisch normal erscheinenden Gewebes. Die verminderte CAV1-Expression wurde zudem auch in endothelialen Zellen des Tumorbereiches beobachtet (Abb. 3-13).

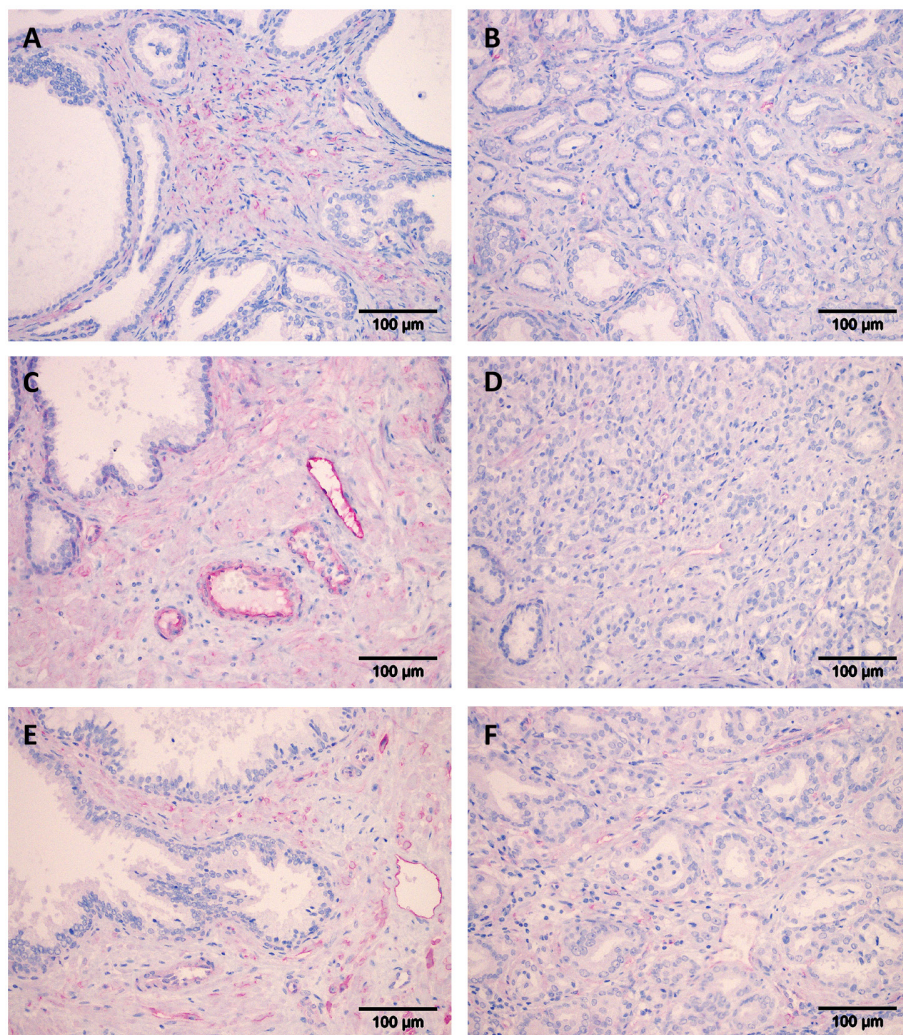


Abb. 3-13: CAV1-Proteinexpression im (A, C, E) histologisch gesund erscheinenden Normal- und (B, D, F) Tumorgewebe von drei repräsentativen Patienten im paarweisen Vergleich (A-B; C-D; E-F). Erkennbar ist ein deutlich verringertes CAV1-Vorkommen in tumorösen Bereichen bei Vergleich mit korrespondierenden Normalgewebsebenen. (Vergrößerung: 200x)

3.2.10 CAV1-Expression in Lymphknotenmetastasen

Neben den Untersuchungen zur CAV1-Proteinexpression im prostatistischen Tumor- und angrenzenden Normalgewebe wurde die CAV1-Expression zusätzlich in Lymphknotenmetastasen immunhistologisch an Lymphknotengewebeschnitten im TMA-Format von 62 Patienten (nicht prostatektomiert, nach Strahlentherapie) überprüft.

Alle untersuchten Lymphknotenmetastasen zeigten keine CAV1-Lokalisierung in den metastasierten Zellen. Die Färbung beschränkte sich auf endotheliale und stromale Strukturen (Abb. 3-14).

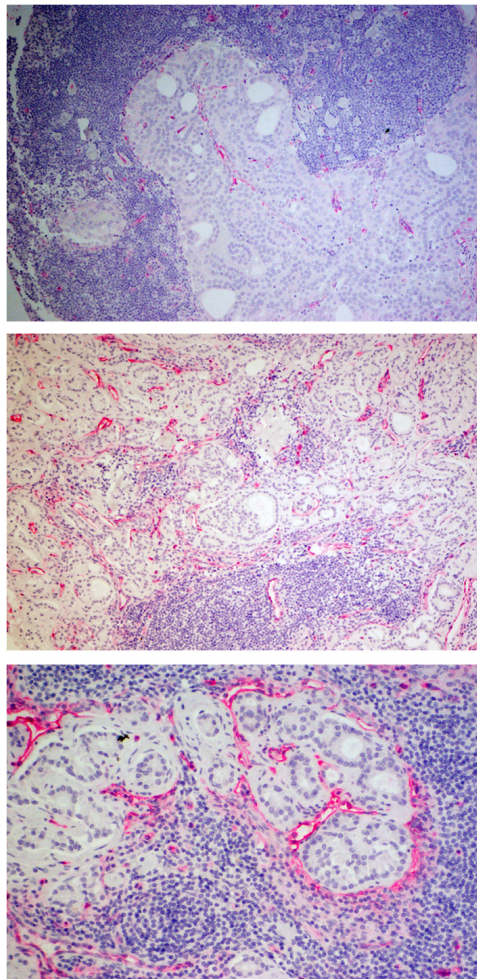


Abb. 3-14: Immunhistochemische Analyse der CAV1-Proteinexpression in Metastasen des Lymphknotens von drei repräsentativen PCa-Patienten. Gut erkennbar ist die überwiegende endotheliale Lokalisierung des Proteins, wohingegen keine Expression in metastasierten Tumorzellen vorhanden ist.

3.2.11 CAV1-Expression in prostatistischen Zelllinien

Neben den immunhistologischen Lokalisierungsstudien wurde die CAV1-Expression in den gängigen Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU-145 und PC-3, sowie in BPH-1 analysiert. Die Untersuchung der metastatischen PCa-Zelllinien PC-3 und DU-145 ergab gut detektierbare CAV1-Mengen im Western Blot, wohingegen die androgensensitive Zelllinie LNCaP das Protein (als auch mRNA) nicht exprimierte. Die etablierte BPH-1-Zelllinie, die als nicht-karzinogene Zelllinie den Normalzustand der Prostata repräsentiert, zeigte im Western Blot die größte Menge an exprimiertem CAV1 (Abb. 3-15A).

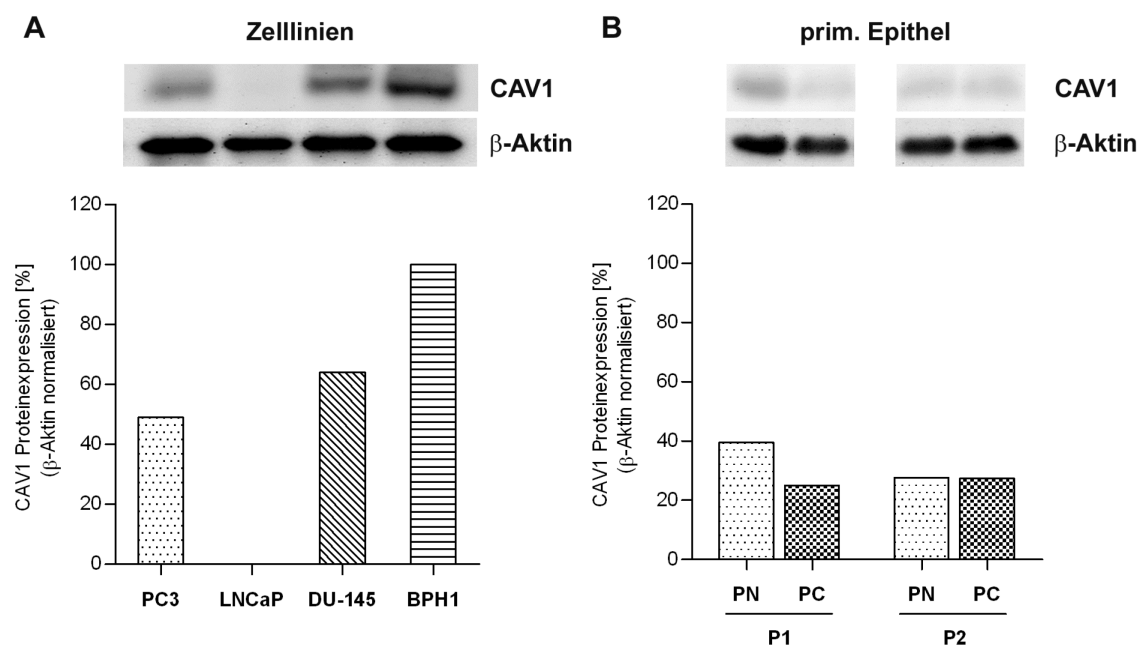


Abb. 3-15: CAV1-Proteinexpression in **(A)** gängigen prostatistischen Zelllinien und **(B)** isolierten Epithelzellen aus prostatistischen Tumor- bzw. tumorangrenzenden Normalgewebsebenen zweier Patienten (P1 und P2). Western Blot mit dazugehöriger Quantifizierung mittels ImageJ-Software. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. PN, isolierte Epithelzellen aus prostatistischem Normalgewebe; PC, isolierte Epithelzellen aus prostatistischem Tumorgewebe

Zudem war es möglich, isolierte primäre epitheliale Prostatazellen von zwei Patienten zu analysieren, die aus gesunden bzw. karzinogenen Bereichen der Prostata stammten. Den immunhistochemischen Analysen entsprechend konnte im Western Blot keine bzw. eine nur sehr schwache CAV1-Expression in den gepaarten Normal- und Tumorbereichen nachgewiesen werden (Abb. 3-15B).

Weiterführend wurde die CAV1-Expression in isolierten primären prostatistischen Stromazellen analysiert, die gleichermaßen aus Normal- bzw. Tumorebenen von vier Patienten

stammten (Abb. 3-16). In zwei der untersuchten Fälle (P1 und P3) konnte in der Stromazell-Primärkultur des Tumorgewebes eine verringerte CAV1-Expression ermittelt werden. Während ein weiterer Fall nahezu keine veränderte Expression aufwies (P4), zeigte der vierte Patient eine deutlich höhere CAV1-Menge im Tumorstroma im Vergleich zu Stromazellen des korrespondierenden Normalgewebes (P2, Abb. 3-16).

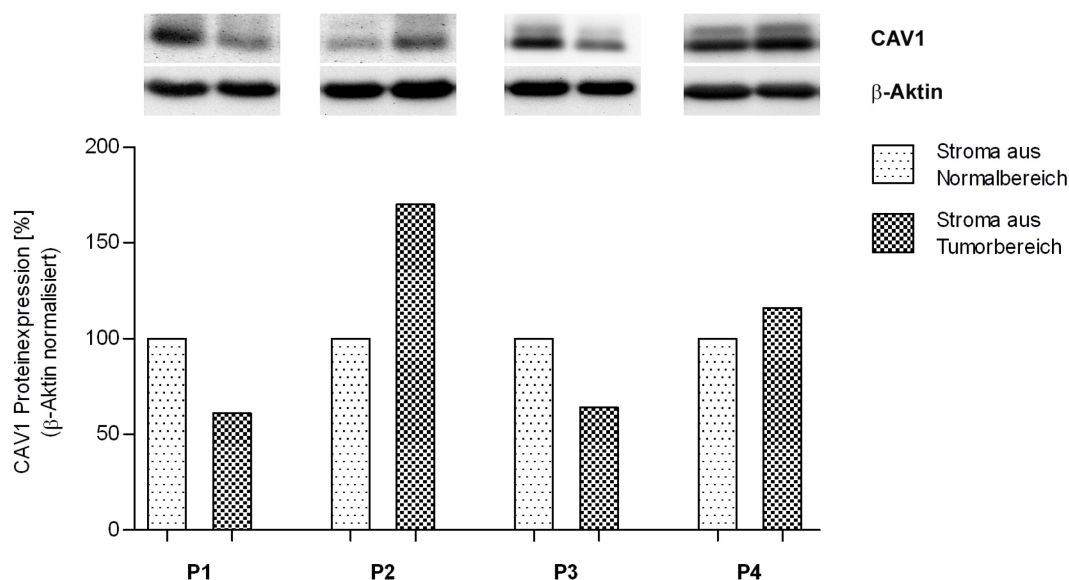


Abb. 3-16: CAV1-Proteinexpression in primären prostatistischen Stromazellen, isoliert aus gesunden und tumoralen Bereichen der Prostata von vier Patienten. Western Blot und dessen Quantifizierung mittels ImageJ-Software. β-Aktin fungiert als Ladekontrolle. P1-4, Patient 1 bis 4.

3.2.12 CAV1-Expression in ko-kultivierten HUVEC-Zellen

Anhand der immunhistologischen CAV1-Lokalisierungsstudien an Großflächenschnitten konnte eine überwiegende Expression des Proteins in endothelialen und stromalen Strukturen nachgewiesen werden, die sich zudem in einigen Fällen zwischen Normal- und Tumorgewebe unterschied (siehe Abschnitt 3.2.9). Es kann daher vermutet werden, dass die Interaktion von Tumorzellen, Endothelzellen und dem Stroma durch parakrine Wechselwirkungsmechanismen zu einer veränderten Proteinexpression führt. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden zunächst Ko-Kultivierungsversuche mit konditionierten Medien prostatistischer Zelllinien und HUVEC-Zellen durchgeführt und die CAV1-Expression auf Proteinebene anhand von Western Blot-Analysen überprüft.

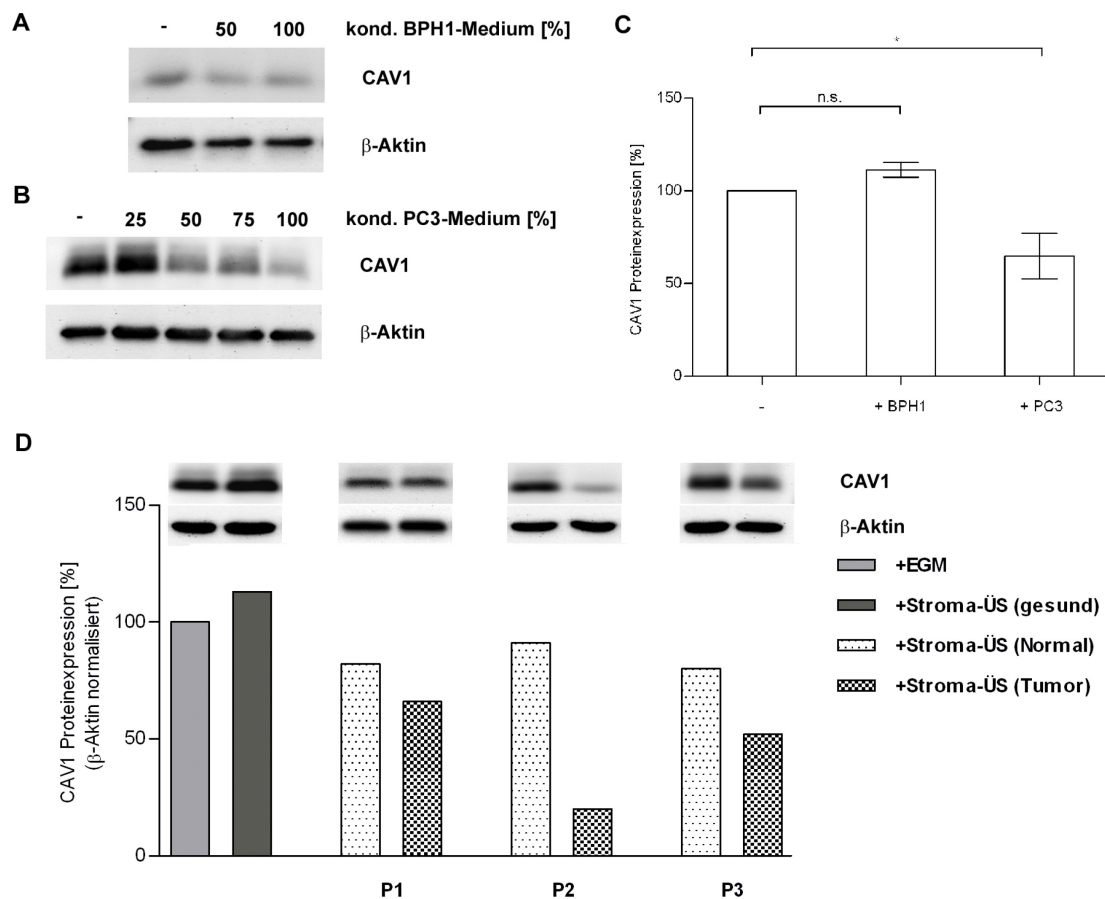


Abb. 3-17: Ko-Kultivierung von HUVEC-Zellen mit konditionierten Zellüberständen von BPH-1, PC-3 bzw. primären Stromazellen aus gesunden und tumorösen Bereichen der Prostata von drei Patienten. PC-3, BPH-1, HUVEC und prostatiche Primärstromazellen wurden zunächst separat in T25-Flaschen bis zu einer Konfluenz von 60 % kultiviert. Danach erfolgte eine Konditionierung aller Zelllinien mit endotheliale Medium (EGM1) für 48 h. Anschließend wurden HUVEC mit entsprechenden prozentualen Anteilen der verschiedenen konditionierten Überständen für weitere 48 h inkubiert. Die endotheliale CAV1-Proteinexpression wurde mittels des Western Blots überprüft. CAV1-Expression in HUVEC nach Behandlung mit konditioniertem **(A)** BPH-1- und **(B)** PC-3-Medium, sowie **(C)** zugehörige Quantifizierung im Vergleich zu normaler Kultivierung (-), normalisiert auf β -Aktin. **(D)** Western Blot und dessen Quantifizierung der CAV1-Expression in HUVEC nach Inkubation mit konditionierten Stromazellüberständen aus Normal- und Tumorbereichen. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. *, $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant; P1-3, Patient 1-3; ÜS, Überstand

Während die Inkubation der Endothelzellen mit 48h-konditioniertem Medium der den prostaticen Normalzustand entsprechenden BPH-1-Zelllinie keine Expressionsänderung ergab, resultierte die Behandlung mit 48h-konditioniertem Medium der PC-3-Zellen in einer signifikanten Verringerung der endothelialen CAV1-Expression (Abb. 3-17A-C). Gleichermäßen bewirkte die Inkubation mit konditioniertem Medium aller zur Verfügung stehenden isolierten Primärkulturen der verschiedenen Stromabereiche (Tumor- bzw. tumorangrenzender Normalbereich) differenzielle CAV1-Expressionsänderungen in den Endothelzellen. Bei Normalisierung der Expression auf die CAV1-Menge unbehandelter HUVEC-Zellen konnte eine um 10-20 % erniedrigte CAV1-Expression in mit Normalstromazellüberstand-behandelten Zellen nachgewiesen werden. Die Behandlung mit konditioniertem Medium stromaler Zellen des Tumorbereiches bewirkte eine

deutlich stärkere Verringerung um 25-85 % (Abb. 3-17D). Im paarweisen Vergleich zeigte sich eine generelle Verringerung der CAV1-Expression nach Inkubation mit tumorösem Stromazell-Überstand. HUVEC-Zellen, die mit konditioniertem Medium prostaticher Stromazellen eines gesunden (tumorfreen) Patienten behandelt wurden, wiesen zudem eine ähnlich hohe CAV1-Expression wie die unbehandelte HUVEC-Zellpopulation auf (Abb. 3-17D).

3.2.13 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die endotheliale CAV1-Expression

Wie in den vorherigen Analysen ersichtlich ist, scheinen parakrine Regulierungsmechanismen zwischen Stroma und Endothelzellen eine veränderte endotheliale CAV1-Expression auszulösen. Zur Untersuchung einer möglichen Beeinflussung durch ausgesuchte Faktoren wurden HUVEC-Zellen mit den Wachstumsfaktoren VEGFA, bFGF und EGF inkubiert und deren Effekt auf die endotheliale CAV1-Expression näher untersucht, um einen Hinweis auf mögliche Faktoren zu bekommen, die als parakrine Regulatoren in Frage kommen könnten.

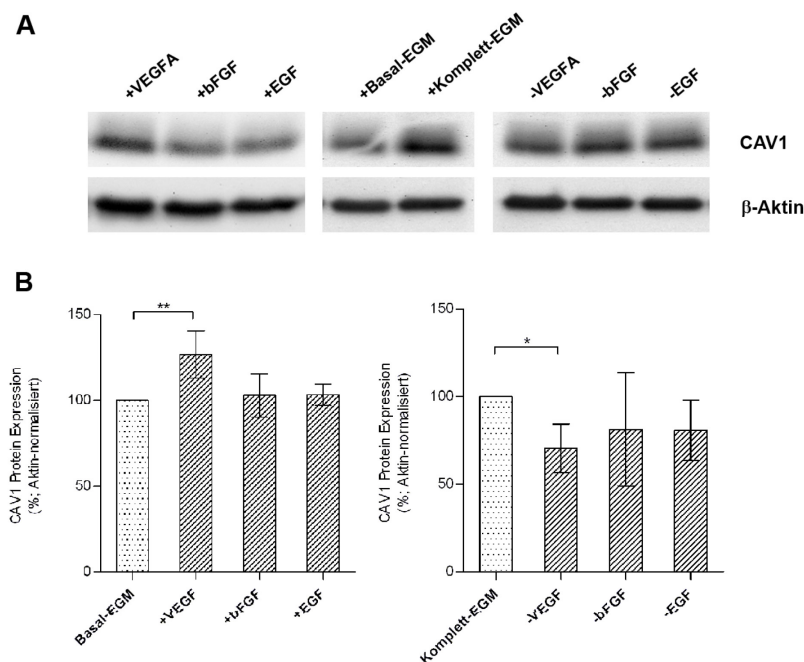


Abb. 3-18: Einfluss von Wachstumsfaktoren (WF) auf die CAV1-Proteinexpression in HUVEC-Zellen. Die Zellen wurden 48 h mit 5 ng/ml VEGFA, bFGF oder EGF inkubiert. Zur Validierung wurde die CAV1-Proteinexpression zusätzlich nach Inkubation mit VEGFA-, bFGF- oder EGF-freiem Endothelzellmedium (bei gleichzeitiger Anwesenheit der beiden anderen Faktoren) ermittelt. β-Aktin fungiert als Ladekontrolle. **(A)** Repräsentativer Western Blot sowie **(B)** Zusammenfassung der Quantifizierungen mittels der Software ImageJ aus mindestens 5 (WF-Zugabe) bzw. 3 (WF-Entzug) unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen. Basal-EGM, Endotheliales Wachstumsmedium+1 % FCS, ohne Zusätze; Komplett-EGM, Endotheliales Wachstumsmedium + 2 % FCS, VEGFA, bFGF, EGF; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

Während die Behandlung mit bFGF und EGF zu keiner veränderten endothelialen CAV1-Expression führte, konnte bei VEGFA-Inkubation eine signifikante Erhöhung der CAV1-Bildung im Vergleich zur unbehandelten Zellpopulation ermittelt werden (Abb. 3-18).

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Expression in HUVEC-Zellen tatsächlich durch VEGFA hervorgerufen wurde, wurde die CAV1-Proteinexpression nach Inkubation der Endothelzellen mit VEGFA-, bFGF-, bzw. EGF-freiem Zellkulturmedium bei gleichzeitiger Anwesenheit der jeweiligen zwei anderen Wachstumsfaktoren bestimmt. Die Behandlung mit VEGFA-freiem Endothelzellmedium resultierte im Vergleich zur normal kultivierten Zellpopulation in einer signifikanten Reduzierung der endothelialen CAV1-Expression um durchschnittlich 25% (Abb. 3-18). Keine signifikanten CAV1-Expressionsänderungen zeigten sich hingegen nach Behandlung mit bFGF- bzw. EGF-freiem Zellkulturmedium.

3.2.14 CAV1-mRNA-Expression im prostatistischen Gewebe

Wie bereits im Abschnitt 3.2.2 gezeigt wurde, ergab sich anhand der durchgeführten Genexpressionsanalyse bei Untersuchung von 69 Patienten eine um rund 1,9-fach verringerte CAV1-Transkriptmenge im Tumorbereich bei Vergleich mit dem korrespondierenden tumorfreien Normalgewebe. Bei spezieller Betrachtung der CAV1-Expressionsänderungen der einzelnen Patienten zeigten 87 % aller untersuchten Fälle eine Herunterregulierung in einem Bereich von -1,25 bis -24,42 (Abb. 3-19). Eine erhöhte tumorale CAV1-Expression wiesen acht Fälle auf, deren Fold Changes in einem Bereich von 1,13 bis 4,38 lagen. Weitere drei Patienten zeigten keine Expressionsänderungen (Fold Changes=1,00).

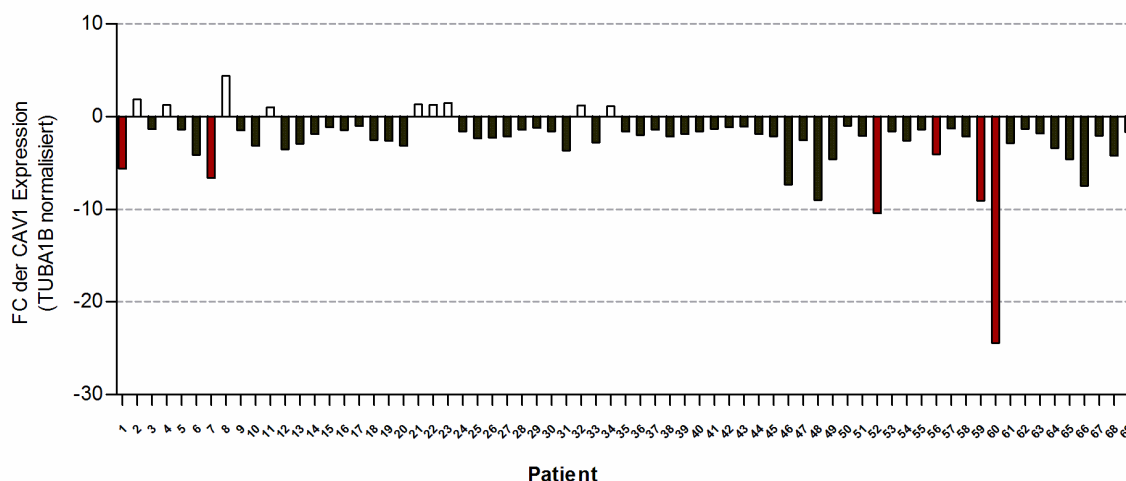


Abb. 3-19: CAV1-mRNA-Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe aller 69 Patienten, gezeigt als Expressionsänderungen (Fold Changes (FC)). Die für die Bisulfit-Sequenzierung verwendeten Fälle (siehe Abschnitt 3.2.15) sind als rote Balken markiert.

3.2.15 DNA-Promotormethylierung und CAV1-Expression

Die deutlich verringerte CAV1-mRNA-Expression im prostatistischen Tumorgewebe könnte aufgrund epigenetischer Regulationsmechanismen zustande kommen. So wiesen Engelman et al. [178] bei Untersuchung von Brustkrebszelllinien darauf hin, dass die Expression des CAV1 durch die Methylierung eines sieben CpG-Dinukleotide umfassenden Promotorabschnittes reguliert werden könnte. Die Methylierungszustände dieser sieben möglicherweise relevanten CpG-Dinukleotide (Abb. 3-20A, blaues Fragment) sollten daher durch Bisulfit-Sequenzierungsanalysen genauer betrachtet werden. Tumorangrenzendes Normal- als auch Tumorgewebe von sechs Patienten mit deutlich verringerter CAV1-mRNA-Expression (siehe Abb. 3-19: Patient 1, 7, 52, 59 und 60) wurden für die Untersuchungen ausgewählt. Abb. 3-20B zeigt den schematischen Ablauf der Bisulfit-Sequenzierung.

Die Amplifikation der kompletten Fragmente unter Verwendung von Natriumbisulfit-behandelter DNA als Template konnte nicht für alle Gewebeproben vollständig realisiert werden. Daher wurde ein zweites Oligonukleotidpaar eingesetzt, welches ein Fragment mit sechs CpG-Dinukleotiden generierte und damit die Bestimmung der CpG-Methylierung in allen Proben ermöglichte.

Aufgrund der Allelspezifität wurden jeweils sechs bis zehn Klone sequenziert, um eine statistische Aussage über den Ist-Zustand der Methylierung zu treffen. Die Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung sind in Tab. 3-11 dargestellt.

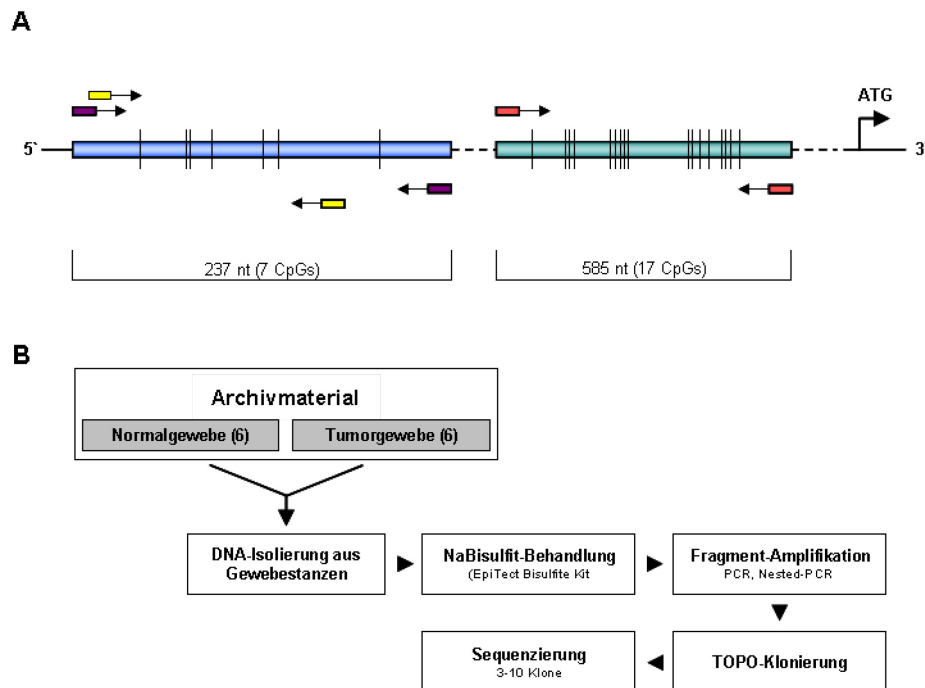


Abb. 3-20: **(A)** Schematische Darstellung des CAV1-Promotorbereiches mit den zu untersuchenden sieben CpG-Dinukleotiden (blaues Fragment) sowie **(B)** experimentelle Vorgehensweise. In den Zelllinien PC-3 und LNCaP wurden zudem weitere 17 CpG-Dinukleotide in einem weiter stromabwärts gelegenen Bereich untersucht (grünes Fragment). Ein senkrechter Strich stellt jeweils ein CpG-Dinukleotid dar. Verwendete Primerpaare zur Amplifikation von Fragmenten mit sechs, sieben bzw. 17 CpG-Dinukleotiden sind als bunte Rechtecke mit Richtungspfeil gekennzeichnet. **(B)** Aufbau des Experiments zur Ermittlung des Methylierungsstatus von sieben CpG-Dinukleotiden im CAV1-Promotor von Paraffin-eingebetteten Gewebeständen aus Tumor- und tumorangrenzenden Normalgewebsebenen von sechs Patienten. Nach Verifizierung von Tumor- und tumorangrenzenden Normalbereichen wurden Gewebestände (\varnothing 1,5 mm) entnommen und genomische DNA isoliert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Natriumbisulfit. Mittels Bisulfit-spezifischer Oligonukleotide erfolgte die Amplifikation der entsprechenden Fragmente. Die über Agarosegele aufgereinigten Produkte wurden anschließend in den TOPO-TA-Vektor kloniert. Je Probe wurden 3-10 Klone sequenziert und mit der Ausgangssequenz (PubMed Acc. No. AC006159.3) abgeglichen. ATG, Translationsstart; nt, Nukleotide.

Methylierte CpG-Dinukleotide konnten in allen untersuchten Proben, jedoch in unterschiedlichem Maße, nachgewiesen werden. Bei Vergleich von Normal- und Tumorgewebe der jeweiligen Patienten zeigte Fall G1 keine Unterschiede in der Methylierung, G7 in der Gesamtheit jedoch eine eher geringere Methylierung im Tumor. In vier von sechs Fällen (G52, G56, G59 und G60) konnte eine stärkere Gesamtmethylierung im Tumorgewebe identifiziert werden (Tab. 3-11). Vor allem ist die Methylierung am vierten bis sechsten CpG auffällig, die im korrespondierenden Normalgewebe eher geringer erscheint. Die epigenetische Modifizierung am CpG1 und CpG2 scheint dabei jedoch im Normal- als auch im Tumorgewebe häufig aufzutreten (Tab. 3-11). Eine Modifizierung im tumorangrenzenden Normalgewebe konnte für Patient G52 nur am CpG2 nachgewiesen werden, wohingegen zusätzlich CpG1, -3 und -4 im Tumorgewebe methyliert vorlagen. Eine deutlich erhöhte Methylierung fast aller CpG-Dinukleotide zeigte sich im Tumorgewebe der Fälle G56 und G59.

Tab. 3-11: Bisulfit-Sequenzierung von genomischer DNA, isoliert aus prostatiscnem Normal- und Tumorgewebe von sechs Patienten. Je Patient und Gewebeprobe wurden 6-10 Klone einer Sequenzierung unterzogen. ●, methyliert; ○, unmethyliert; -, nicht bestimmbar; G, Gewebe; CpG, CpG-Dinukleotid

tumorangrenzendes Normalgewebe								Tumorgewebe										
	Klon	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7		Klon	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7	
G1	1	●	●	●	●	○	○	-	G1	1	●	●	●	●	○	○	-	
	2	●	●	●	●	○	○	-		2	●	●	●	●	○	○	-	
	3	●	●	●	●	○	○	-		3	●	●	●	●	○	○	-	
	4	●	●	●	●	○	○	-		4	●	●	●	●	○	○	-	
	5	●	●	●	●	○	○	-		5	●	●	●	●	○	○	-	
	6	●	●	●	●	○	○	-		6	●	●	●	●	○	○	-	
	7	●	●	●	●	○	○	-		7	●	●	●	●	○	○	-	
	8	●	●	●	●	○	○	-		8	●	●	●	●	○	○	-	
	9	●	●	●	●	○	○	-		9	●	●	●	●	○	○	-	
	10	●	●	●	●	○	○	-		10	●	●	●	●	○	○	-	
10/10 10/10 10/10 10/10 0/10 0/10 -								10/10 10/10 10/10 10/10 0/10 0/10 -										
G7	1	●	●	●	●	○	○	●	G7	1	○	●	●	○	○	○	-	
	2	●	●	●	●	○	○	●		2	○	●	○	○	●	○	-	
	3	●	●	●	●	○	○	●		3	○	●	●	●	○	○	-	
	4	●	●	●	●	○	○	●		4	○	●	●	●	○	○	-	
	5	●	●	●	●	○	○	●		5	○	●	○	○	●	●	-	
	6	●	●	●	●	○	○	●		6	●	●	●	○	●	○	-	
	7	●	●	●	●	○	○	●		7	●	●	●	○	●	○	-	
	8	●	●	●	●	○	○	●		8	○	●	●	○	○	○	-	
	9	●	●	●	●	○	○	●		9	○	●	○	○	○	○	-	
	10	●	●	●	●	○	○	●		10	●	●	●	-	-	-	-	
10/10 10/10 10/10 10/10 0/10 0/10 10/10								4/10 10/10 7/10 2/9 4/9 1/9 -										
G52	1	○	●	○	○	○	○	○	G52	1	●	○	○	○	○	○	○	
	2	○	●	○	○	○	○	○		2	●	○	○	○	○	○	○	
	3	○	●	○	○	○	○	○		3	○	●	●	○	○	○	○	
	4	○	●	○	○	○	○	○		4	●	○	○	○	○	○	○	
	5	○	●	○	○	○	○	○		5	○	●	●	○	○	○	○	
	6	○	●	○	○	○	○	○		6	●	○	○	○	○	○	○	
	7	○	●	○	○	○	○	○		7	●	○	○	○	○	○	○	
	8	○	●	○	○	○	○	○										
0/8 8/8 0/8 0/8 0/8 0/8 0/8								7/7 2/7 2/7 2/7 0/7 0/7 0/7										
G56	1	●	●	○	○	○	○	○	G56	1	●	●	●	●	●	○	●	
	2	●	●	○	○	○	○	○		2	●	●	●	●	●	●	●	
	3	○	●	○	●	○	○	○		3	○	●	●	●	○	○	●	
	4	●	●	○	○	○	○	○		4	●	●	●	●	●	○	●	
	5	○	●	○	●	○	○	○		5	●	●	●	●	●	○	●	
	6	●	●	○	○	○	○	○		6	●	●	●	●	●	○	●	
	7	●	●	○	○	○	○	○		7	●	●	●	●	●	○	●	
	8	●	●	○	○	○	○	○		8	●	●	●	●	●	○	●	
	9	●	●	○	○	○	○	○		9	●	●	●	●	●	○	●	
	10	●	●	○	○	○	○	○		10	●	●	●	●	●	●	●	
8/10 10/10 0/10 2/10 0/10 0/10 0/10								10/10 10/10 10/10 10/10 10/10 2/10 10/10										
G59	1	●	●	●	●	○	○	●	G59	1	●	●	●	●	●	●	●	
	2	●	●	●	●	●	○	●		2	●	●	●	●	●	●	●	●
	3	●	●	●	●	○	○	-		3	●	●	●	●	●	●	○	○
	4	●	●	●	●	○	○	●		4	●	●	●	●	●	●	●	●
	5	●	●	●	●	○	○	-		5	●	●	●	●	●	●	○	○
	6	●	●	●	●	○	○	●		6	●	●	●	●	●	●	●	○
	7	●	●	●	○	○	○	○		7	●	●	●	●	●	●	○	○
	8	●	●	●	○	●	○	●		8	●	●	●	●	●	●	○	○
	9	●	●	●	●	○	○	●		9	●	●	●	●	●	●	○	○
	10	●	●	●	●	○	○	○		10	●	●	●	●	●	●	●	○
10/10 10/10 10/10 8/10 2/10 0/10 6/8								10/10 10/10 10/10 10/10 10/10 10/10 3/10										
G60	1	●	●	●	○	○	○	-	G60	1	●	●	●	●	○	○	●	
	2	●	●	●	●	○	○	-		2	●	●	●	●	○	○	●	●
	3	○	○	○	○	○	○	-		3	○	●	●	●	○	○	○	●
	4	●	○	○	●	○	○	-		4	●	●	●	●	○	○	○	●
	5	●	●	●	●	●	○	-		5	●	●	●	●	○	○	○	●
	6	●	●	○	○	●	○	-		6	●	●	●	●	○	○	○	●
	7	●	●	●	●	○	○	-										
	8	●	●	●	●	○	○	-										
	9	●	○	○	○	○	○	-										
	10	●	●	●	○	○	●	-										
9/10 7/10 6/10 5/10 2/10 1/10 -								6/6 6/6 6/6 6/6 0/6 0/6 6/6										

Abb. 3-21 stellt die Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung prozentual zusammengefasst im sogenannten Lollipop-Diagramm dar. Ab CpG3 war eine deutliche Erhöhung der Methylierungsereignisse im tumoralen Gewebe erkennbar.

Methylierungsunterschiede konnten besonders bei CpG5 und CpG6 gefunden werden, da bei Vergleich der prozentualen Methylierung zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe eine Erhöhung von 7 % auf 46 % (CpG5) bzw. 2 % auf 25 % (CpG6) nachweisbar war.

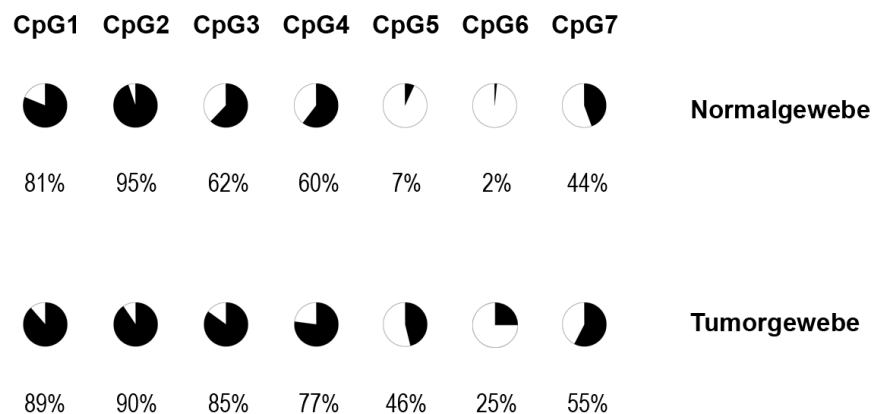


Abb. 3-21: Zusammenfassende Darstellung der Methylierungszustände der 7 CpG-Dinukleotide im CAV1-Promotor bei Gegenüberstellung von prostaticem Tumor- und tumorangrenzenden Normalgewebe aller sechs untersuchten Patienten.

Neben der Analyse von archiviertem Gewebe wurden zudem die beiden Zelllinien BPH-1 und LNCaP einer Bisulfit-Sequenzierung unterzogen. Ergänzt wurde diese durch die Sequenzierung eines weiteren Promotorabschnittes stromabwärts liegend mit 17 CpG-Dinukleotiden (schematische, nicht maßstabsgetreue Darstellung der sequenzierten Bereiche siehe Abb. 3-20, grünes Fragment).

Während die normale Prostatazelllinie BPH-1 in beiden analysierten Promotorbereichen keine Methylierung zeigte (Tab. 3-12), konnten für LNCaP-Zellen Methylierungsereignisse am CpG1, CpG2, CpG3, CpG4 und CpG7 nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich die Methylierung vereinzelt am CpG1, CpG10, CpG16 und CpG17 des zweiten analysierten Fragments.

Tab. 3-12: Bisulfit-Sequenzierung von genomischer DNA aus den prostatichen Zelllinien BPH-1 und LNCaP. Gezeigt ist der Methylierungsstatus der CpG-Dinukleotide in zwei untersuchten Fragmenten des CAV1-Promotors.

BPH-1								Fragment A								Fragment B																
Klon	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	Klon	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	C 8	C 9	C 10	C 11	C 12	C 13	C 14	C 15	C 16	C 17							
1	o	o	o	o	o	o	o	1	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o							
2	o	o	o	o	o	o	o	2	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o							
3	o	o	o	o	o	o	o	3	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o							
								4	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o							
								5	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o							

LNCaP								Fragment A								Fragment B																
Klon	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	Klon	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	C 8	C 9	C 10	C 11	C 12	C 13	C 14	C 15	C 16	C 17							
1	o	o	●	o	o	o	●	1	●	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o							
2	●	o	●	●	o	o	o	2	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o							
3	●	o	●	●	o	o	o	3	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o							
4	o	o	o	o	o	o	o	4	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	●	●							
5	●	●	o	o	o	o	●	5	o	o	o	o	o	o	o	o	o	●	o	o	o	o	o	o	o							
6	●	o	o	o	o	o	o	6	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	-	-	-	-	-	-							
7	●	o	o	o	o	o	-																									
8	●	o	o	o	o	o	-																									

3.2.16 CAV1-Reexpression durch Demethylierung

Die Behandlung von Zellen mit demethylierenden Substanzen wie Zebularin oder 5-Aza-2-desoxycytidin (Decitabin) beeinflussen die Expression verschiedener Gene, indem sie als Cytidinanaloga während der Replikation in die sich neu bildende DNA eingebaut werden und eine Inhibierung von Methyltransferasen verursachen [129, 130].

Um zu untersuchen, ob auch die Expression des CAV1 durch eine Demethylierung der DNA beeinflussbar ist, wurden LNCaP-Zellen in vitro sieben Tage mit 5-Aza-2-desoxycytidin unterschiedlicher Konzentration behandelt. Anhand des zuvor durchgeführten XTT-Proliferationsassays zur Bestimmung der Substanztoxizität wurden Konzentrationen von 5-100 μ M verwendet. Höhere Konzentrationen führten zum schnellen Zelltod. Aufgrund der Einlagerung der Substanz in die DNA und des resultierenden Verbrauchs wurde die Substanz im Zuge eines Mediumwechsels alle 48 h erneuert.

Durch die Gabe von 5-Aza-2-desoxycytidin konnte in LNCaP-Zellen eine konzentrationsabhängige Reexpression der CAV1-mRNA induziert werden (Abb. 3-22). Die Behandlung mit dem Deacetyltransferase-Inhibitor TSA ergab keine Reexpression des Gens. Des Weiteren zeigte die kombinierte Behandlung von LNCaP-Zellen mit 5-Aza-2-desoxycytidin und TSA

erwartungsgemäß keinen synergistischen Effekt im Vergleich zu der Zellpopulation, die nur mit 5-Aza-2-desoxycytidin behandelt wurde (Daten nicht gezeigt).

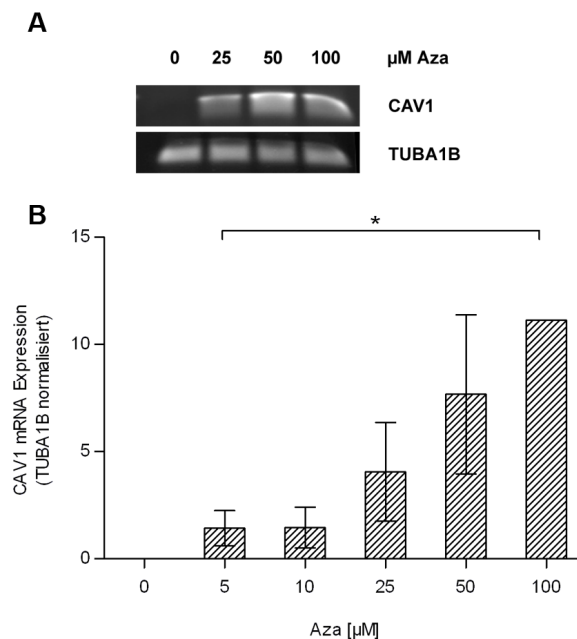


Abb. 3-22: CAV1-mRNA-Reexpression durch 5-Aza-2-desoxycytidin. LNCaP-Zellen wurden über sieben Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen des Cytidinanalogons 5-Aza-2-desoxydytidin behandelt. Ein Mediumwechsel mit entsprechender Substanzkonzentration erfolgte alle 48 h. **(A)** Agarosegel der amplifizierten CAV1- und korrespondierenden TUBA1B-Fragmente nach Durchführung der PCR. **(B)** Quantifizierung der CAV1-Reexpression. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Messung der CAV1-Expression nach Inkubation mit 100 µM Aza erfolgte einmalig. One Way-ANOVA: *, $p < 0,05$; Aza, 5-Aza-2-desoxycytidin.

3.2.17 Promotor-Reporter-Gen-Analysen

Anhand der Resultate der Bisulfit-Sequenzierung konnten differenzielle Methylierungsmuster zwischen Normal- und Tumorgewebe im CAV1-Promotor erkannt werden. Um zu untersuchen, welche der sieben analysierten CpG-Dinukleotide im CAV1-Promotorabschnitt eine explizite Expressionsänderung des Gens hervorrufen, wurden zusätzlich in vitro Promotor-Reporter-Gen-Analysen mit Hilfe des Reportergens Luziferase durchgeführt.

Die jeweiligen zu analysierenden Promotorabschnitte wurden so konzipiert, dass der die sieben relevanten CpG-Dinukleotide enthaltende Genabschnitt mit verschiedenen Vorwärtsoligonukleotiden bei gleich bleibendem Rückwärtsoligonukleotid amplifiziert wurde. Dabei wurden Konstrukte mit unterschiedlichem CpG-Gehalt generiert (ein bis sieben CpGs), die in den Luziferase-enthaltenden pGL3-Basic-Vektor kloniert wurden. Jedes Konstrukt wurde zum einen als Wildtyp in PC-3-Zellen transfiziert, zum anderen vor Transfektion einer Behandlung mit der CpG-methylierenden Methyltransferase M. SssI unterzogen, um eine komplette Methylierung der

Promotorkonstrukte zu simulieren. Zur Normalisierung wurde der pRL-TK-Vektor mit integrierter Renilla-Luziferase zusätzlich ko-transfiziert.

Bei Vergleich der Luziferaseaktivitäten nach Transfektion der unmethylierten Konstrukte mit jeweils unterschiedlichem CpG-Gehalt konnte eine tendenzielle Erhöhung der Luziferaseaktivität mit zunehmender Promotorfragmentgröße ermittelt werden (Abb. 3-23, weiße Balken). Besonders die drei bzw. fünf CpG-Dinukleotide-enthaltenden Fragmente bewirkten eine signifikante Erhöhung der Luziferaseaktivität. Eine kontinuierliche Zunahme ab einer bestimmten Fragmentgröße wurde nicht beobachtet.

Die Transfektion der einzelnen Promotorkonstrukte nach Methyltransferase M. SssI-Behandlung resultierte in einer generellen Reduzierung der Luziferaseaktivität im Vergleich zum jeweils unmethylierten Zustand (Abb. 3-23, graue Balken). Dabei verursachte die universelle Methylierung der einzelnen Konstrukte eine deutliche Expressionshemmung des Reportergens, die für alle analysierten Konstrukte annähernd gleich stark war. Es lässt sich daher keine Aussage darüber treffen, welche(s) CpG-Dinukleotid(e) durch Methylierung maßgeblich für eine Reduzierung der CAV1-Expression verantwortlich sein könnte(n).

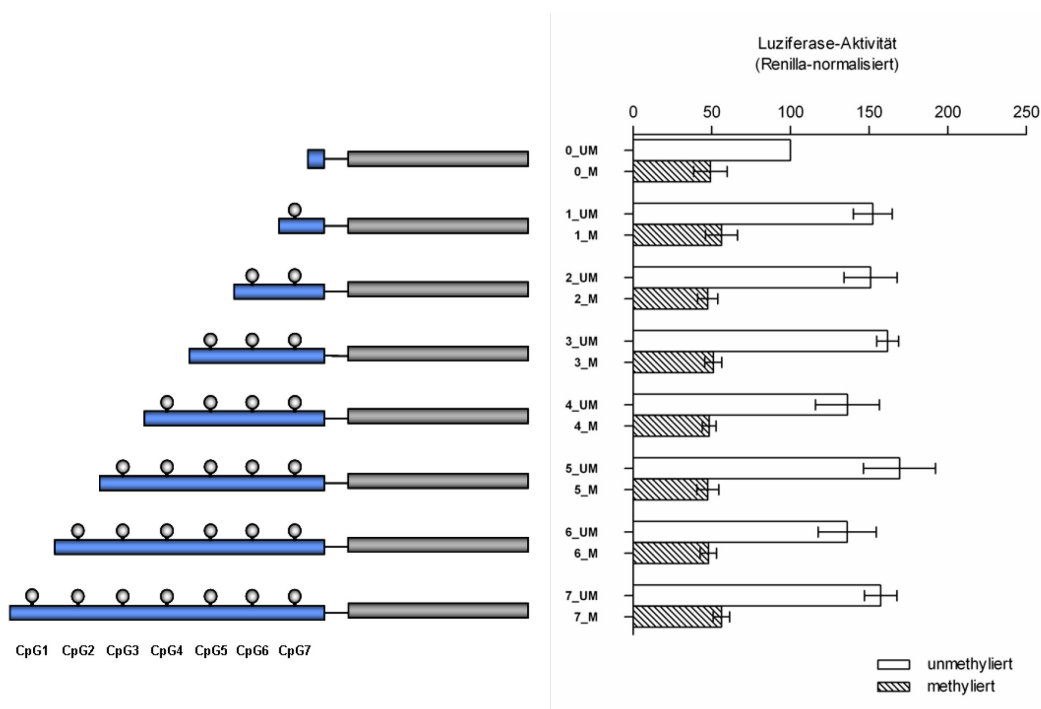


Abb. 3-23: Promotor-Reporter-Gen-Assay. Die sich anhand der Anzahl der CpG-Dinukleotide unterscheidenden Fragmente wurden in den pGL3-Basic-Vektor kloniert und mit bzw. ohne vorheriger Methyltransferase M.SssI-Behandlung in PC-3-Zellen für 24 h transfiziert. Zusätzlich erfolgte eine Ko-Transfektion mit dem pRL-TK-Vektor zur Normalisierung (enthält kodierende Sequenz des Renilla-Luziferase-Gens). Die Luziferaseaktivität wurde anhand der entstehenden Lumineszenz am Mithras LB940-Plattenreader ermittelt und auf die Renilla-Aktivität normalisiert. Balken repräsentieren den Mittelwert (+/-SEM) aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

3.2.18 Einfluss der CAV1-Expression auf die Metalloproteinasen MMP2 und MMP9

Kürzlich wiesen Han et al. [185] einen Zusammenhang der CAV1-Expression mit der Expression und Aktivität verschiedener Metalloproteinasen (MMP2 und MMP9) in Krebszelllinien des Pankreas nach. Anhand von CAV1-Knockdown und –Überexpressionsexperimenten sollte daher in prostatistischen Krebszelllinien zusätzlich eine mögliche Regulierung der MMP2- bzw. MMP9-Expression untersucht werden. Hierbei wurde durch Herunterregulierung des Proteins durch eine spezifisch gegen CAV1 gerichtete siRNA bzw. durch Transfektion eines CAV1-Expressionsvektors die Beeinflussung der MMP2- und MMP9-Expression im Überstand kultivierter PCa-Zelllinien untersucht. Anhand der Zymographie ließen sich Aktivitätsbestimmungen der Gelatine-abhängigen Metalloproteinasen vornehmen.

Nach initialen Experimenten zur Etablierung des CAV1-Knockdowns konnte in der PC-3-Zelllinie bei Verwendung von 5 nmol siRNA und einer Transfektionsdauer von 72 h sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene eine Herunterregulierung um durchschnittlich rund 60 % erreicht werden (Abb. 3-24A, B). Eine 48-stündige transiente Überexpression des pcDNA3.1(-)-CAV1-Expressionsplasmids mit integrierter codierender Sequenz des CAV1-Gens ergab eine deutlich erkennbare Reexpression in der CAV1-defizienten Zelllinie LNCaP (Abb. 3-24C, D).

Um eine eventuelle Beeinflussung der MMP2- und MMP9-Aktivität nach veränderter CAV1-Expression in den prostatistischen Zelllinien zu erkennen, wurden die Zellkulturüberstände der transient transfizierten Zellen anhand der Zymographie zur Ermittlung des Gelatine-Degradierungspotenzials der MMPs untersucht. Zur Überprüfung der erfolgreichen Überexpression bzw. des Knockdowns von CAV1 wurden die jeweiligen Zelllysate stets parallel analysiert. In allen drei unabhängigen Versuchen konnte eine erfolgreiche Herunter- bzw. Hochregulierung des CAV1-Proteins in den Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3-24A-D).

Generell zeigte der Zellkulturüberstand von LNCaP-Zellen im Gegensatz zur PC-3-Zelllinie deutlich geringere MMP2- und MMP9-Aktivitäten. MMP9 konnte besonders ausgeprägt im PC-3-Zellkulturüberstand nachgewiesen werden.

Sowohl die Überexpression als auch die Herunterregulierung der CAV1-Expression zeigten keinen Einfluss auf die Aktivitäten von MMP2 und MMP9 (Abb. 3-24E, F). Eine signifikante Erhöhung der MMP9-Aktivität in PC-3-Zellkulturüberständen nach Knockdown konnte zwar gefunden werden, jedoch zeigte sich dies auch in der mit Kontroll-siRNA transfizierten PC-3-Zellkulturüberstandpopulation. Es ist davon auszugehen, dass CAV1 keinen Einfluss auf die Aktivitäten von MMP2 und MMP9 in diesen Prostatakarzinomzelllinien ausübt.

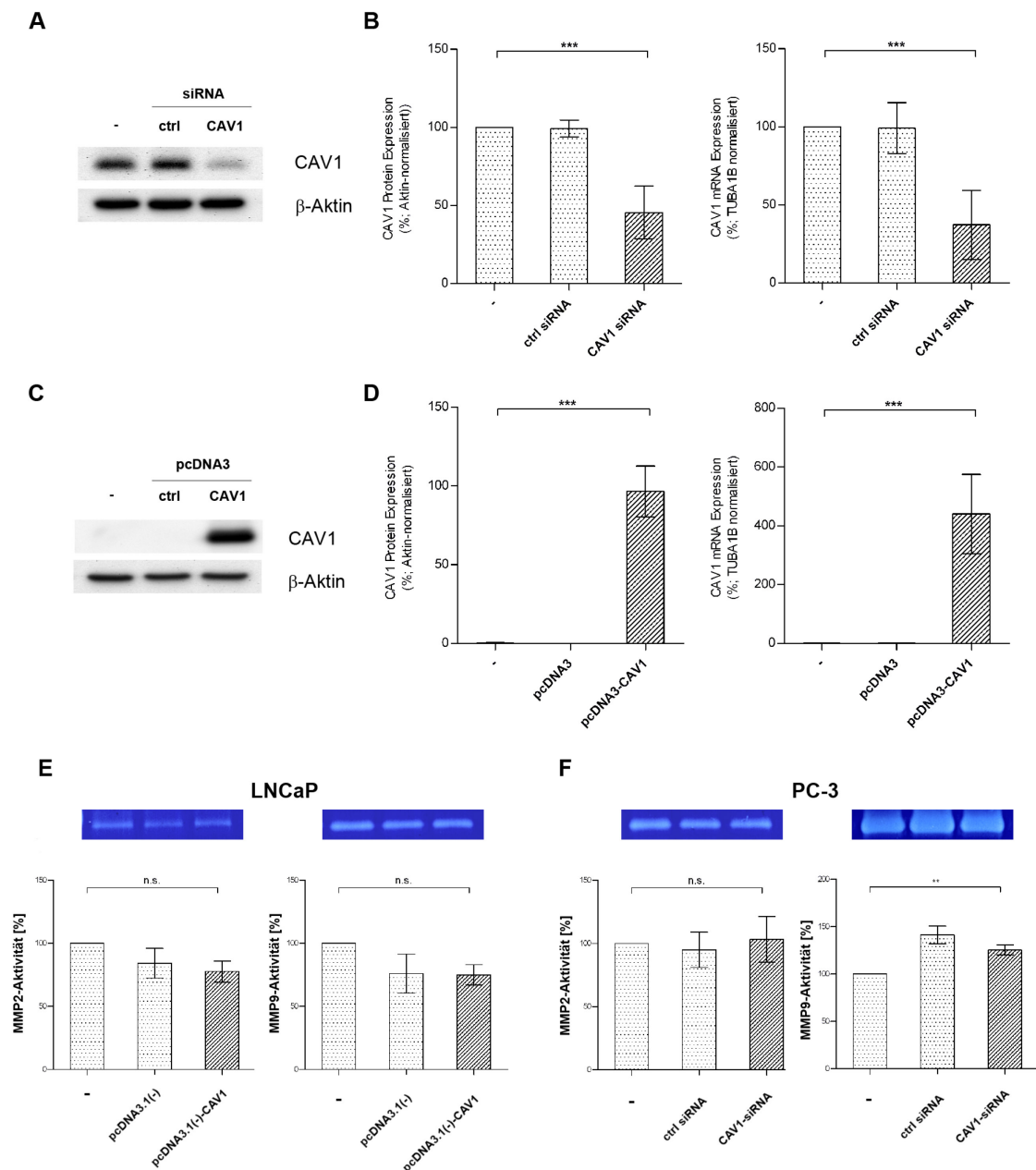


Abb. 3-24: Beeinflussung der MMP2- und MMP9-Aktivität durch CAV1. **(A-D)** Etablierung des CAV1-Knockdown und der -Überexpression in PC-3- bzw. LNCaP-Zellen. Dargestellt ist jeweils **(A, C)** ein repräsentativer Western Blot bzw. **(B, D)** die Quantifizierungen der Western Blots bzw. RT-qPCR-Ergebnisse. 48 h nach Transfektion von LNCaP-Zellen mit dem CAV1-exprimierenden Vektor pcDNA3.1(-)-CAV1 und dem leeren Vektor als Kontrolle, bzw. nach 72-stündiger Transfektion von PC-3-Zellen mit 5 nmol CAV1-spezifischer siRNA bzw. 5 nmol Kontroll-siRNA erfolgte die Protein- als auch mRNA-Isolierung sowie die Analyse mittels Western Blot bzw. RT-qPCR. Dabei diente β-Aktin zur Normalisierung der Proteinmenge, TUBA1B als Referenzgen zur mRNA-Mengenquantifizierung. **(E)** MMP2- bzw. MMP9-Aktivitätsmessungen nach CAV1-Überexpression in LNCaP-Zellen bzw. **(F)** nach CAV1-Knockdown in PC-3-Zellen. 48 h nach Transfektion erfolgte eine Inkubation in serumfreiem Medium für weitere 24 h. Die Mediumüberstände wurden mittels der Zymographie auf die Expression und Aktivitäten der Metalloproteasen MMP2 und -9 analysiert. One-Way-ANOVA, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. (-), unbehandelte Zellen; ctrl, Kontroll-Transfektion; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; n.s., nicht signifikant

4 Diskussion

4.1 Der epigenetische Feldeffekt im prostatichen Gewebe

Die Tumorentwicklung geht mit molekularen Veränderungen in der Zelle einher, die im frühen Stadium morphologisch noch nicht erkennbar sind. Eine veränderte Expression von Genen, die die Proliferation, Migration und Invasion von Zellen steuern, ist ein entscheidendes Kriterium für die Tumorentstehung. Dabei können epigenetische Regulationsmechanismen eine Rolle spielen, die häufig durch Inhibierung der Expression von Tumorsuppressor- und anderen karzinomrelevanten Genen die Krebsentstehung fördern [62]. Die frühen molekularen Modulationen innerhalb der Zelle könnten daher eine besondere Bedeutung für eine frühzeitige Tumorerkennung besitzen. Das bereits ausführlich erläuterte PSA-Problem in der Prostatakarzinomdiagnostik sowie die Stanzbiopsiedurchführung mit häufig falsch-negativem Ergebnis machen die Identifizierung neuer Marker notwendig, die in Zusammenhang mit etablierten Parametern die Diagnostik des Prostatakarzinoms, insbesondere in Gewebestanzbiopsien, erleichtern und verbessern. Ein Schwerpunkt der Dissertationsarbeit lag daher in der Untersuchung eines epigenetischen Feldeffektes beim Prostatakarzinom zur Ermittlung einer möglichen Eignung als diagnostisches Mittel.

Anhand der vergleichenden Bestimmung der Promotormethylierung in Tumor- und tumorangrenzenden Normalgewebeproben sowie in gesundem Kontrollgewebe konnte RAR β 2 als besonders interessant identifiziert werden. Es wies in annähernd allen neoplastischen Gewebeproben (PIN) und in der Mehrzahl der tumorbenachbarten benignen Regionen eine erhöhte Methylierung auf, nicht dagegen in den Gewebeproben aus komplett tumorfreien Prostata. In einer weiteren Patientenkohorte konnten diese Beobachtungen zusätzlich bestätigt werden. Schon seine Lage im Genom auf Chromosom 3p24, einer Region mit häufig vorkommendem Heterozygotie-Verlust und Deletionen, legt nahe, dass RAR β 2 als Tumorsuppressor in seiner Expression im Verlaufe der Krebsentwicklung moduliert wird [186]. Dass RAR β 2 im kanzerogenen Gewebe epigenetisch modifiziert sein kann, konnte unter anderem im Brustkrebs-, Darm- und Lungenkarzinom in vitro nachgewiesen werden [187]. Differenzielle Hypermethylierungsmuster zeigten sich auch im Prostatakarzinomgewebe [188-191]. Die Resultate legen daher nahe, dass die Diagnostik von biopsiertem Gewebematerial anhand von Routineuntersuchungen mit zusätzlicher RAR β 2-Methylierungsbestimmung Hinweise auf das Vorhandensein eines Tumorherdes geben könnte.

Während RAR β 2 auch im tumorbenachbarten Normalgewebe eine detektierbare Methylierung aufwies, konnte GSTP1 nur tumorspezifisch und in PIN-Gewebeproben hypermethyliert gefunden werden. Die GSTP1-Promotormethylierung zeigt daher eine hohe Sensitivität und weist auf einen möglichen Nutzen als diagnostischer Marker hin, was den Angaben anderer Studien entspricht [192-194]. Im Gegensatz dazu zeigten jedoch Rabiau et al. [195] in 15 nicht-malignen Gewebeproben eine erhöhte Methylierung im GSTP1-Promotor. Auch Hanson et al. [196] wiesen detektierbare Methylierungsraten in Epithel- und Stromazellen aus morphologisch normal erscheinenden Gewebsarealen nahe des Tumors nach Mikrodissektion nach, was zur Annahme eines Methylierungsfeldeffektes beim GSTP1 führte. Allerdings wurde bei der Gewebsentnahme nicht die exakte Entfernung zum Tumor dokumentiert, wodurch eine erhöhte Methylierung in den Normalgewebeproben womöglich aufgrund der Mitnahme von einzelnen Tumorzellen verursacht wurde. Die in dieser Dissertation ermittelte ausschließliche GSTP1-Hypermethylierung in neoplastischem Gewebe ist daher ein Indikator für die Reinheit der analysierten Proben und unterstreicht den Nutzen der GSTP1-Hypermethylierung als spezifisches Merkmal prostaticher Tumorzellen.

Erhöhte Methylierungsraten im Tumor konnten auch für die Gene APC und PITX2 ermittelt werden. Im Gegensatz zu RAR β 2 wiesen beide Gene jedoch nur in seltenen Fällen eine über das Kontrollgewebe hinausgehende Methylierung im tumorbenachbarten benignen Gewebe auf. PITX2 zeigte zusätzlich bereits in den komplett tumorfreien Kontrollgewebeproben eine deutliche Grundmethylierung, was eine Eignung als diagnostisches Mittel ausschließt. Des Weiteren korrelierte die PITX2-Hypermethylierung nicht mit pathologischen Parametern wie Gleason-Grad und Tumorstadium. Allerdings wiesen kürzlich Weiss et al. [124] eine prognostische Bedeutung des PITX2 für das Prostatakarzinom nach. Dabei erwies sich die Promotorhypermethylierung nach Analyse von 605 Patienten als unabhängiger Marker für ein PSA-Rezidiv. Somit scheint die PITX2-Hypermethylierung eher mit dem Rezidiv-freien Überleben als mit der Tumorausdehnung und dem Tumorgad assoziiert zu sein.

Die Methylierungsrate des APC-Gens assoziierte signifikant mit dem primären Gleason-Grad und zeigt daher Potenzial als Aggressivitätsmarker. Dies bestätigt die Aussagen von Richiardi et al. [197], deren Untersuchungen an einer Kohorte von 243 Patienten aus den 1990er Jahren zu ähnlichen Resultaten führten. In einem zweiten Patientenkollektiv (216 Patienten, aus den 1980er Jahren) konnten sie diese Aussage jedoch nicht bestätigen und wiesen auf das seit Beginn der 1990er Jahre vermehrt durchgeführte PSA-Screening als Ursache hin, das zur Erkennung vieler früher Tumorstadien geführt hat [197]. Des Weiteren konnte eine prognostische Bedeutung für die APC-Hypermethylierung erkannt werden, die bei Patienten mit guter und moderater Tumordifferenzierung mit dem Rezidiv-freien Überleben assoziierte, für schlecht differenzierte

Tumore jedoch nicht zutraf [197]. Dies legt für APC eine mögliche Rolle speziell in frühen Phasen der Tumorentstehung nahe, während es im fortgeschrittenen Stadium möglicherweise nur wenig zum malignen Potenzial beiträgt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen für GSTP1 signifikante Assoziationen mit pathologischen Parametern wie Gleason-Grad und/oder pT-Stadium. In der Literatur wird dies jedoch kontrovers diskutiert [121, 197, 198]. So fanden Zhou et al. [198] bei 109 untersuchten Gewebebiopsien von 40 Patienten eine signifikant erhöhte Methylierung mit zunehmendem Gleason Score und Karzinomvolumen, was auf eine mögliche prognostische Rolle der GSTP1-Methylierung hindeutet. Neben den Analysen zum APC konnten auch Richiardi et al. [197] eine prognostische Relevanz der GSTP1-Methylierung erkennen. Dass die GSTP1-Methylierung allein nicht mit Faktoren der Tumorprogression korreliert, demonstrierten Bastian et al. [121]. Ihre Untersuchungen ergaben, dass die Methylierung von zwei oder drei Genloci (GSTP1, APC, PTGS2) als kombiniertes Kriterium eine bessere Korrelation mit den pathologischen Merkmalen Tumorstadium und –grad gibt als bei Betrachtung von Einzelloci [121]. Eine Ursache dieser zum Teil differenten Ergebnisse könnte zu einem gewissen Grad auf die Verwendung unterschiedlicher Bestimmungsmethoden zurückzuführen sein. Die Auswahl der Patienten und regionale klinische Bedingungen sind ebenso ausschlaggebend. Erkennbar ist jedoch, dass die Promotorhypermethylierung eine wichtige Komponente in der Regulierung krebsrelevanter Gene darstellt und als Kriterium für eine frühzeitige Diagnostik und Progressionsabschätzung geeignet sein kann.

Des Weiteren korrelierte auch die tumorale Hypermethylierung des RAR β 2-Promotors im untersuchten Patientenkollektiv signifikant mit dem primären Gleason-Grad. Dies konnten andere Autoren bestätigen, die die RAR β 2-Methylierung im prostatatischen Gewebe oder in Urinsedimenten untersuchten [199, 200]. Dass die Methylierung allgemein auch in Körperflüssigkeiten wie Serum oder Urin nachweisbar ist, ist besonders in Hinblick auf die nicht-invasive Probengewinnung für den Patienten interessant.

Die Hypermethylierung im Promotor sowohl des GSTP1- als auch des PITX2-Gens korrelierte signifikant mit dem Patientenalter. Einen Zusammenhang zwischen dem Methylierungsausmaß und dem fortschreitendem Alter deuteten bereits Kwabi-Addo et al. [201] an, die bei der Analyse von normalem Prostatagewebe mit ansteigendem Patientenalter eine Zunahme der Methylierung unter anderem in den Promotoren der Gene GSTP1 und RAR β 2 nachwiesen. Dass die altersabhängige Methylierung gewebeabhängig ist, wurde von Christensen et al. [202] demonstriert, die neben einer Zunahme auch von einer altersabhängigen Abnahme der Methylierung berichteten. Die globale Methylierung vermindert sich mit zunehmendem Alter [203], was durch eine passive Demethylierung repetitiver DNA-Bereiche aufgrund einer fortschreitenden DNMT1-Aktivitätsminderung verursacht sein könnte [204, 205]. Zusätzlich wurde

eine Überexpression der de novo-Methylase DNMT3b beobachtet, womit eine verstärkt auftretende Hypermethylierung von CpG-Inseln erklärt werden könnte [204, 205]. Es liegt daher nahe, dass eine erhöhte Methylierungsrate in den untersuchten Genen zu einem gewissen Grad ein natürlicher Prozess des Alterns darstellt und durch Beeinflussung krebsrelevanter Gene eine Krebsentwicklung gefördert wird.

4.2 MethylProfiler-Studie: Interessante Gene und deren diagnostisches Potenzial

Im Zuge eines Profiling zur Identifizierung weiterer Gene, die aufgrund eines Methylierungsfeldeffektes zur frühzeitigen PCa-Diagnostik geeignet sein könnten, wurde die häufig im PCa-Gewebe vorkommende hohe Methylierung im GSTP1-Gen bestätigt. Allerdings zeigte das Normalgewebe zweier Patienten eine erkennbare Methylierung, die jedoch im korrespondierenden Tumorgewebe deutlich höher lag. Die Ursache hierfür könnte in der Durchführung unterschiedlicher Untersuchungsmethoden liegen, da hier nicht die Natriumbisulfit-Behandlung, sondern methylierungssensitive bzw. –abhängige Restriktionsenzyme zur Differenzierung von methylierten und nichtmethylierten Bereichen zum Einsatz kamen. Bestätigt werden konnten anhand dieser Methode zudem die detektierbaren Methylierungsraten im RAR β 2- bzw. APC-Promotor der tumorangrenzenden Normalgewebeproben, was ihre Bedeutung in der Tumorentwicklung untermauert.

Im Hinblick eines möglichen Methylierungsfeldeffektes sind all die Gene interessant, die neben einer deutlich ausgeprägten Hypermethylierung im Tumorgewebe zusätzlich erhöhte Methylierungsraten im tumorangrenzenden Gewebe aufweisen und dadurch das Vorhandensein eines Tumors auch bei Entnahme morphologisch normal erscheinender Gewebeproben vorhersagen könnten. Besonders bei den Genen ZNF185, MSX1, RASSF1 und GPX3 war dieser Sachverhalt in der Profiling-Studie ausgeprägt.

Das auf Chromosom 10q28 liegende *zinc finger protein 185* (ZNF185)-Gen kodiert für ein Aktin-Zytoskelett-assoziiertes Protein mit wachstumsregulatorischem Potenzial [206]. Es gehört zu den LIM¹⁶-Domäne-enhaltenden Proteinen, die bei der Regulierung der Zellproliferation und Differenzierung wichtige Aufgaben übernehmen [207-209]. Dass ZNF185 beim Prostatakarzinom herunterreguliert ist, konnten Vanaja et al. [210] anhand von Oligonukleotidarrays mit anschließender RT-qPCR-Validierung demonstrieren. Die Behandlung der Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, PC-3 und LAPC4 mit dem DNMT1-Inhibitor 5-Aza-2-desoxycytidin resultierte in

¹⁶ LIM: Zink-Fingerstruktur einiger Proteine (u.a. Transkriptionsfaktoren, Kinasen etc.), ermöglicht Protein-Protein-Interaktionen

einer zweifach erhöhten, mit der Tumorprogression korrelierenden mRNA-Expression, was zu der Annahme einer möglichen Involvierung epigenetischer Mechanismen führte [210]. Eine Methylierung des Gens im benignen Gewebe wurde anhand von qMSP-Untersuchungen von diesen Autoren nicht gefunden. Dies steht in Widerspruch zu den Resultaten des Profiling der vorliegenden Dissertationsarbeit, da hier eine deutliche Methylierung in allen verifizierten tumornahen Normalgewebeproben zu erkennen war. Weiterführende Analysen zur Nützlichkeit der ZNF185-Methylierung als diagnostischen Marker sollten daher durchgeführt werden.

Ein weiteres in Frage kommendes Gen zur Analysierung des Methylierungsfeldeffekts stellt MSX1 dar. Es ist ein Gen, das im Profiling neben einer kontinuierlich detektierbaren tumoralen Methylierung auch im tumorangrenzenden Normalgewebe eine deutlich nachweisbare Methylierung aufwies. MSX1 ist ein Mitglied der Homeobox-Proteinfamilie, die eine wichtige Rolle bei der Embryogenese spielt, indem sie die Zelldifferenzierung und Morphogenese kontrollieren [211, 212]. Die Expression von Homeobox-Genen ist in verschiedenen Krebsarten verändert [213, 214]. MSX-Gene werden während der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) gebildet und wirken im Ras-Signalweg während der Tumorentwicklung [215]. Eine herunterregulierte tumorale MSX1-Expression wurde beim Gebärmutterhalskrebs beschrieben, was einer möglichen Tumorsuppressorrolle in dieser Tumorentität entspricht [216]. Anhand methylierungsspezifischer PCR-Untersuchungen wurden kürzlich epigenetische Veränderungen bei epithelialen Tumoren der Brust, Lunge, des Darm und der Prostata identifiziert [217]. In letzterer Entität wiesen 20 von insgesamt 24 analysierten Patientenproben eine erhöhte Methylierung auf, die auch im angrenzenden benignem Gewebe in 10 Proben zu finden war. Dies bestätigt die hier ermittelten Ergebnisse einer vorhandenen Methylierung im tumornahen Normalgewebe.

RASSF1 (*Ras association domain family 1*) stellt ein Tumorsuppressorgen auf Chromosom 3p21.3 dar, das häufig beim Lungenkarzinom von Heterozygotieverlust (loss of heterozygosity, LOH) betroffen ist [218]. Obwohl RASSF1 keine enzymatische Aktivität besitzt, hat es funktionelle Bedeutung bei apoptotischen Prozessen, in der Regulierung des Zellzyklus und der genetischen Stabilität [219]. Zwei CpG-Inseln im Promotorbereich des Gens wurden identifiziert [219]. Epigenetische Veränderungen konnten im RASSF1-Gen in Tumorentitäten wie dem Lungen- und Brustkarzinom, beim Nieren-, Leber- und Blasenkrebs und vielen weiteren Tumoren nachgewiesen werden [220-225]. Die Hypermethylierung beider Allele führt zu einer verminderten Expression des Gens [226], die durch 5-Aza-2-desoxycytidin-Behandlung wieder reaktiviert werden kann [227]. Eine RASSF1-Hypermethylierung tritt auch beim Prostatakarzinom auf. So untersuchten Mehrotra et al. [192] die RASSF1-Methylierung in Tumor- und tumorangrenzenden Normalgewebe von 11 Patienten und wiesen erhöhte Methylierungsraten im Tumor und in nicht-malignen Bereichen nach. In einer weiteren Studie von Jeronimo et al. [228]

zeigten sich nach Analyse von benignem und malignen Gewebe von 118 Patienten erhöhte tumorale Methylierungsraten im Vergleich mit HGPIN¹⁷-Gewebebeobachten. Erhöhte Methylierungsraten zeigten sich jedoch zusätzlich auch im analysierten BPH-Gewebe, was in Anbetracht einer möglichen Markerfunktion eher problematisch ist.

Erhöhte Methylierungsraten sowohl im Tumor- als auch tumorangrenzenden Normalgewebe konnten anhand der Profiling-Studie des Weiteren für das auf Chromosom 5q23 liegende Gen GPX3 ermittelt werden. Dieses Gen kodiert für das Selen-abhängige Enzym Glutathionperoxidase 3, das für die Detoxifikation von Hydrogenperoxiden und anderen Radikalen zuständig ist. GPX3 wird sezerniert und ist in Serum und Plasma nachweisbar [229]. In Expressionsanalysen konnte GPX3 als eines der am häufigsten herunterregulierten Gene beim Prostatakarzinom identifiziert werden. So ergaben Microarray-Analysen und ihre Validierung mittels RT-qPCR eine 5- bis 10fache Expressionsänderung im Tumor- bei Vergleich mit tumornahem Normalgewebe [230]. Neben gehäuft auftretenden Deletionen spielt auch eine hohe Methylierung im Genpromotor eine wichtige Rolle [230, 231]. Eine Überexpression des Enzyms führt zu einem reduzierten Wachstums- und Invasionspotenzial in vitro und im Mausmodell [230].

Neben den Genen, die auch im tumorangrenzenden Normalgewebe erhöhte Promotormethylierung aufwiesen, konnten aus der Profiling-Studie zusätzlich Gene identifiziert werden, deren Methylierung sich nur auf den Tumor beschränkte. Hier sind vor allem die Gene OPCML, PDLIM4, TIMP2, EDNRB und CAV1 zu nennen.

OPCML (*opioid binding protein/cell adhesion molecule-like gene*) gehört zu einer Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen, die Funktionen in der Zell-Zell-Erkennung und Zelladhäsion im Nervengewebe bewerkstelligt [232]. Das auf Chromosom 11q25 liegende Gen wurde von Cui et al. [233] als mögliches Tumorsuppressorgen mit verminderter tumoraler Expression beim Nasen-Rachenkarzinom nachgewiesen. Eine verminderte OPCML-Expression im kanzerogenen Gewebe wurde auch in Hirn- und Magentumoren beschrieben [234, 235]. Des Weiteren wurde es beim Eierstockkrebs als Suppressor identifiziert, der durch Deletionen und epigenetische Promotormethylierung reguliert wird [236]. Eine Hypermethylierung des Gens wurde zudem auch beim Lungenkarzinom nachgewiesen [237]. Cui et al. [233] identifizierten zwar in den prostatistischen Karzinomzelllinien PC-3 und DU-145 methylierte Anteile des OPCML-Gens, jedoch konnte dies in Tumorgewebsproben nicht erkannt werden. Dies steht im Kontrast zu den ermittelten Ergebnissen des Profilings in der Dissertationsarbeit, da in der Mehrzahl der untersuchten Proben eine deutliche Methylierung im Tumorgewebe identifiziert wurde. Weitere

¹⁷ HGPIN: hochgradige prostatistische intraepitheliale Hyperplasie, gilt als Vorstufe eines Prostatakarzinoms

Untersuchungen zur Bedeutung der OPCML-Hypermethylierung sind daher nötig, um eine einheitliche Aussage treffen zu können.

PDLIM4 (*PDZ and LIM Domain Protein 4*) ist in vielen Karzinomen hypermethyliert, besonders bei Darmkrebs und akuter myeloischer Leukämie [238]. Das auf Chromosom 5q31 liegende Gen zeigte in vorangegangenen Arbeiten auch beim Prostatakarzinom differenzielle Hypermethylierungsmuster. So konnten Vanaja et al. [239] nach Analyse von 52 kanzerogenen und 20 benignen Gewebeproben die PDLIM4-Methylierung als möglichen neuen diagnostischen Marker für das Prostatakarzinom mit einer Sensitivität von 97 % und einer Spezifität von 90 % identifizieren.

TIMP2 (*TIMP Metalloproteinase Inhibitor 2*) ist einer von vier Faktoren (TIMP1-4) der TIMP-Familie, die die Aktivität von Metalloproteinasen regulieren [240]. TIMPs sind beteiligt am Zellwachstum, an der Apoptose und Angiogenese, der Tumorprogression, Invasion und Metastasierung [240-243]. Mohanam et al. [244] wiesen eine Herunterregulierung der TIMP2-Expression in Glioblastomen und metastasierten Lungenkarzinomen nach. Dass epigenetische Einflüsse die TIMP2-Expression regulieren können, wurde bei Untersuchungen am Kolonkarzinom gefunden [245]. Des Weiteren führte die Behandlung von Pankreaskarzinomzelllinien mit der demethylierenden Substanz 5-Aza-2-desoxycytidin sowie dem Deacetylase-Inhibitor SAHA (Suberoylanilidhydroxamidsäure) zu einer Reexpression von TIMP2 [246]. Im prostatistischen Gewebe wurde die Relevanz der Promotorhypermethylierung im TIMP2-Gen durch Pulukuri et al. [247] detaillierter beleuchtet. Die Expressionsanalyse der metastatischen Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, PC-3 und DU-145, die TIMP2 nicht exprimieren, ergab dabei eine deutliche Hypermethylierung, deren Aufhebung durch Behandlung mit 5-Aza-2-desoxycytidin und TSA zu einem TIMP2-Anstieg auf mRNA-Ebene und zusätzlich zu einer signifikanten Reduktion des Invasionspotenzials führte [247]. Immunhistochemische Lokalisierungsstudien zeigten zudem eine deutlich verringerte Expression im Tumor im Vergleich zum angrenzenden Gewebe [247].

Das EDNRB-Gen, das für den G-Protein-gekoppelten Endothelin B-Rezeptor codiert, ist ein auf Chromosom 13q22 liegendes Tumorsuppressorgen [248]. Es ist beteiligt an Endothelin-induzierten Wachstums- und Transformationsprozessen während der Embryogenese [249]. Im 5'-untranslatierten Promotorbereich konnten zahlreiche CpG-Dinukleotide nachgewiesen werden, die zur Regulierung der EDNRB-Expression beitragen [250, 251]. Eine Hypermethylierung im Promotorbereich des EDNRB-Gens wurde in Tumoren der Lunge, Speiseröhre, des Nasenrachenbereiches sowie der Leber identifiziert [252-255]. Hinweise einer gesteigerten EDNRB-Methylierung im prostatistischen Tumorgewebe konnten Nelson et al. [251] in 70 % aller untersuchten Patientenproben finden, wohingegen das Gen im Normalgewebe nur unmethyliert nachzuweisen war. Jeronimo et al. [256] bestätigten zwar eine erhöhte Tumormethylierung in

80 % ihrer untersuchten Fälle, allerdings war diese auch im korrespondierendem Normalgewebe und BPH-Gewebe erhöht, was die diagnostische Relevanz der EDNRB-Methylierung eher anzweifelt.

Die Resultate des durchgeführten Profilings in der vorliegenden Arbeit stellen einen Überblick über potenzielle epigenetische Faktoren zur Prostatakarzinomdiagnostik dar. Limitierend ist hierbei, dass keine komplett tumorfreien Gewebeproben zur Kontrolle mitgeführt wurden. Die sorgfältige und genaue Verifizierung von Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe zum Vergleich weisen jedoch grundsätzlich auf eventuelle Unterschiede zwischen den Gewebebereichen hin. Die ermittelten Resultate sind kongruent zu vorangegangenen Studien und zeigen, dass epigenetische Regulierungsmechanismen in der Tat eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung und –progression spielen. Die diagnostische und/oder prognostische Aussagekraft der Genpromotorhypermethylierung beim Prostatakarzinom muss anhand weiterführender Studien untersucht werden. Die Aufklärung des Zusammenspiels dieser Faktoren sollte vorangetrieben werden, um eventuelle Einsatzmöglichkeiten zur Diagnose und Behandlung von Krebserkrankungen im Allgemeinen zu erkennen und weiterentwickeln zu können.

4.3 Endotheliale Faktoren im prostatistischen Gewebe

Die Induktion der Blutgefäßneubildung ist für die Entwicklung eines Tumors essenziell. Mit zunehmendem Wachstum muss der Tumor seine Eigenversorgung dahingehend gewährleisten, dass neue Mikrogefäße zum bereits bestehenden Gefäßsystem ausbildet werden. Dieser Sachverhalt wurde erstmals im Jahre 1972 durch Gimbrone et al. [136] nachgewiesen. Die Angiogenese stellt daher einen interessanten Aspekt in der Tumordiagnostik und -behandlung dar. In den letzten Jahren entwickelte Angiogenese-Inhibitoren werden bereits zur Behandlung solider Tumore eingesetzt.

Die Mikrogefäßdichte (MVD) als Indikator der Angiogenese ist ein wichtiger Marker für das fortschreitende Tumorstadium. Der Zusammenhang mit der Tumorstadium konnte in verschiedenen Tumorentitäten bereits belegt werden [139, 257, 258]. Die Bedeutung der Mikrogefäßdichte beim Prostatakarzinom, speziell in kleinen Gewebestanzbiopsien, die bei einem PCa-Verdacht zur ersten Untersuchung dem Patienten entnommen werden und ausschlaggebend für die weitere Behandlung sind, ist heutzutage jedoch noch immer nicht geklärt. Daher stand die MVD-Bestimmung im prostatistischen Gewebe auf histologischer Ebene bzw. die Untersuchung ausgesuchter Endothel-assoziiierter Faktoren auf mRNA-Ebene und deren Bedeutung in der Tumorstadium zusätzlich im Fokus dieser Dissertation.

Die herkömmliche Bestimmung der MVD erfolgt histologisch durch Auszählung von Mikrogefäßen, die anhand der Markierung von Endothelzellen immunhistochemisch visualisiert werden. Die Verwendung verschiedener Marker wie CD31, CD34, CD105 oder Von Willebrand Faktor könnte dabei eine Ursache für die zum Teil nicht kongruenten Ergebnisse zur Bedeutung der MVD beim PCa sein [139-143, 149, 259-264]. Da bis dato keine Vergleiche zur Ermittlung des am besten geeigneten Markers zur MVD-Bestimmung publiziert wurden, ist eine Bewertung der einzelnen Studien nur bedingt möglich. In dieser Dissertation konnte auf immunhistochemischer Ebene eine gute Korrelation zwischen den beiden Endothelzellmarkern CD31 und CD34 gefunden werden. Darüber hinaus zeigte die MVD im untersuchten Patientenkollektiv signifikante Assoziationen mit Tumorgrad und –stadium. Dies unterstreicht zum einen die Nutzbarkeit beider Faktoren zur Mikrogefäßevaluierung, zum anderen lassen sich durch die MVD-Bestimmung wertvolle Informationen zur Tumorprogression beim Prostatakarzinom ableiten.

Inwieweit die MVD, die mikroskopisch in einem Bereich mit großem angiogenetischen Potenzial (Wachstumsfront) ermittelt wird, wichtige Informationen liefern kann, hängt auch von der Zusammensetzung des zu analysierenden Patientenkollektivs ab. So untersuchten Silberman et al. [143] nur PCa-Patienten mit Gleason-Graden von 5-7. Sie konnten zeigen, dass die MVD einen unabhängigen prognostischen Marker darstellt, während Gettman et al. [265] bei Untersuchung von ausschließlich pT2-Stadium-Patienten keine prognostische Signifikanz in uni- oder multivariaten Analysen fanden. In einer anderen Studie ergab die Untersuchung eines aus PCa-Gewebe von über 3200 Patienten bestehenden TMA, dass die MVD in einer univariaten Analyse zwar signifikant sowohl mit dem Tumorstadium als auch dem Gleason Score korrelierte bzw. als Prädiktor eines möglichen PSA-Wiederanstiegs fungierte, sich jedoch in der multivariaten Analyse nicht als unabhängiger Parameter herausstellte [266].

Weiterhin ist die Ermittlung der MVD sehr zeitintensiv und hängt zusätzlich von der auswertenden Person ab. Hinweise auf eine erfolgreiche Quantifizierung der Angiogenese anhand anderer Techniken, wie der RT-qPCR, wurden daher bereits durch Loges et al. [267] aufgezeigt. Dabei korrelierten sie die Transkriptmengen endothelialer und lymphangiogenetischer Faktoren mit der histologisch verifizierten MVD und schlugen die Faktoren CD144 und VEGFR2 vor, die für die Quantifizierung der MVD beim Speiseröhrenkrebs eingesetzt werden könnten [267].

Die in der vorliegenden Dissertation durchgeführte Genexpressionsanalyse zeigte keine signifikanten Korrelationen zwischen den untersuchten Transkriptmengen und der histologisch ermittelten MVD. Die Quantifizierung der Angiogenese auf Grundlage der hier analysierten endothelialen Transkriptmengen ist damit beim Prostatakarzinom eher nicht möglich. Allerdings neigte die CAV1-mRNA-Expression zur negativen Korrelation mit der Gefäßdichte, was einer möglichen Bedeutung im angiogenetischen Prozess entsprechen könnte. Neben den Resultaten

von Loges et al. [267] nach Untersuchung von Patienten mit Speiseröhrenkrebs konnten auch Parker et al. [268] in Brusttumoren Korrelationen der CD144-mRNA-Expression mit der histologisch determinierten MVD nachweisen. Eine mögliche Erklärung der fehlenden Korrelation endothelialer Faktoren mit der MVD beim Prostatakarzinom könnte darin liegen, dass die Wachstumsgeschwindigkeiten von Tumoren des prostaticischen Gewebes im Vergleich zu Speiseröhre oder Brust erheblich niedriger liegen und so die angiogenetische Dynamik deutlich geringer ausgeprägt ist.

Weiterführend wurden die mRNA-Expressionen der untersuchten endothelialen Faktoren im paarweisen Vergleich zwischen Tumor- und tumorangrenzendem Normalgewebe anhand von Fold Changes bewertet. Die Expressionen der untersuchten endothelialen Faktoren zeigten starke Korrelationen untereinander. Dies ist aufgrund der Spezifität der Lokalisierung auf bzw. in endothelialen Strukturen im Gewebe auch nicht verwunderlich und spiegelt den korrekten Nachweis endothelialer Marker im untersuchten Gewebe wider.

Der klassische Endothelzellmarker CD31 als auch CD144 wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumor- und tumorangrenzendem Normalgewebe auf. Dass jedoch eine veränderte Expression bei einer Krebserkrankung im Tumor vorhanden sein kann, konnten Martin et al. [269] für CD144 nachweisen, dessen Transkriptmenge im tumorösen Gewebe von Brustkrebspatienten erhöht vorlag. Diese differenten Beobachtungen sind womöglich wiederum anhand der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der Tumoren von Prostata und Brust zu erklären.

Die Analyse ergab des Weiteren zum Teil hoch signifikante Expressionsunterschiede für CD105, CD34, CD146, VEGFR2 und VEGFA bei Vergleich von Tumor- mit tumorangrenzendem Normalgewebe. Da die Änderungsraten trotz zum Teil hoher statistischer Signifikanzen zwischen malignem und nicht-malignem Gewebe jedoch eher nur moderat sind, ist in weiterführenden Studien deshalb zu klären, ob diese Expressionsunterschiede biologische Relevanz besitzen.

Das Setzen eines Grenzwertes von 1,5 (bzw. -1,5) anhand der Fold Changes im Vorfeld der Studien brachte den Faktor CAV1 in den Mittelpunkt der weiteren Analysen, auf den im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

4.4 CAV1 als Marker des Prostatakarzinoms

In dieser Arbeit konnte besonders für das CAV1 eine deutlich verringerte mRNA-Expression in rund 90 % der untersuchten tumorösen Gewebeproben im Vergleich zum tumorangrenzenden Normalgewebe identifiziert werden. Anhand einer ROC-Analyse ergab sich zudem eine gute Trennung maligner und nicht-maligner Gewebeproben, was einem möglichen diagnostischen

Potential entspricht. Zwar müssen in weiterführenden Studien größere Patientenkollektive auf diesen Zusammenhang hin analysiert werden, jedoch zeigen die bereits ermittelten Ergebnisse einen eindeutigen Trend für die CAV1-Expression beim Prostatakarzinom auf.

Eine deutlich verringerte tumorale CAV1-mRNA-Expression im Vergleich mit angrenzendem Normalgewebe wurde vor allem bei Brustkrebspatienten festgestellt [270, 271]. Auch zeigten kultivierte NIH-3T3-Zellen während der onkogenen Transformation eine verringerte CAV1-Expression auf mRNA- und Proteinebene, wonach postuliert wurde, dass funktionelle Änderungen in den Caveolen den Prozess der Transformation möglicherweise durch Störung der Kontakthemmung transformierender Zellen beeinflussen könnten [272]. Hinweise auf eine verringerte CAV1-Expression beim Prostatakarzinom wurden im Jahr 2005 anhand eines cDNA-Microarray beschrieben [273]. Bachmann et al. [274] zeigten kürzlich eine Herunterregulierung der CAV1-mRNA bei Untersuchung von gepaarten malignen und nicht-malignen Gewebeproben von 35 Patienten nach radikaler Prostatektomie. Dabei vermuteten sie aufgrund vorhandener CpG-Inseln im CAV1-Promotorbereich eine etwaige Beteiligung regulatorischer Mechanismen auf epigenetischer Ebene. Sie identifizierten einen Promotorabschnitt mit sieben CpG-Dinukleotiden, deren Methylierung zu einer Herunterregulierung der CAV1-Transkription führen könnte [274]. Erst kürzlich wurde eine weitere Arbeit zur CAV1-mRNA-Expression in der Niere veröffentlicht, die jedoch zu gegensätzlichen Ergebnissen führte [275]. Hierbei wurde ein Kollektiv aus 109 Nierenzellkarzinompatienten und 81 korrespondierenden Normalgeweben untersucht und eine signifikante Erhöhung der Expression im Tumor identifiziert. Dies zeigt, dass in anderen Tumorentitäten durchaus andere Mechanismen ablaufen als in der Prostata.

Neben der deutlichen Herunterregulierung im Tumorgewebe zeigte die CAV1-mRNA-Expression im untersuchten Patientenkollektiv zudem prognostische Aussagekraft. Eine verminderte Transkriptbildung ging dabei mit einem deutlich schlechteren Rezidiv-freien Überleben (hier: PSA-Wiederaufstieg) einher. Des Weiteren lag eine negative Korrelation mit der Tumorausdehnung (pT) und der –aggressivität (Gleason Score) vor, so dass die Bestimmung der CAV1-mRNA-Expression eine gewisse Aussage über den individuellen Verlauf einer Tumorerkrankung geben könnte. Hierzu müssen jedoch zunächst größere Patientenzahlen untersucht werden, um auch multivariate Analysen durchführen zu können.

Entgegen Untersuchungsergebnissen in der Leber, die zum Teil eine deutliche zytoplasmatische Färbung tumoröser Epithelzellen zeigten [276], ergaben immunhistochemische Lokalisierungsstudien des in der vorliegenden Arbeit analysierten Patientenkollektivs anhand von TMA- und Großflächenschnitten des prostatistischen Gewebes ein überwiegend stromales Vorkommen des CAV1-Proteins, was vor allem im fibromuskulären Gewebe und in Gefäßstrukturen ausgeprägt war. Bei Vergleich der stromalen Regionen des Normal- und Tumor-

bereiches jedes Patienten konnte in einer Subpopulation des untersuchten Patientenkollektivs eine verringerte CAV1-Expression im tumorösen Stroma erkannt werden. Dies wurde anhand der Untersuchung isolierter Primärstromazellen aus Tumor- bzw. tumorangrenzenden Normalgewebearealen der Prostata bestätigt.

Epitheliale-stromale Interaktionen sind in der Tumorentwicklung von entscheidender Bedeutung. Das Tumorstroma ist dabei ein wichtiger Regulator von Proliferation, Vaskularisierung und Invasion neoplastischer Epithelzellen [277-279]. So wurde für das Prostatakarzinom gezeigt, dass prostatiche Fibroblasten die Proliferation und Apoptose von Tumorzellen über parakrine Mechanismen beeinflussen können [280-282]. Dass die stromale CAV1-Distribution zwischen gesunden und tumorösen Bereichen variiert, könnte daher ein Indiz für eine mögliche Bedeutung des CAV1 bei epithelialen-stromalen Wechselwirkungsmechanismen in der Tumorentwicklung sein. Kürzlich untersuchten Di Vizio et al. [283] anhand immunhistochemischer TMA-Analysen von Geweben aus 30 BPH-Patienten, 36 lokalisierten Prostatakarzinomen und 36 Metastasen die CAV1-Verteilung im Stroma. Dabei korrelierte die CAV1-Abwesenheit direkt mit der Progression der PCa-Erkrankung. Eine verringerte stromale CAV1-Expression wurde auch bei Brustkrebspatienten gefunden und stand hier in enger Beziehung zu verschiedenen pathologischen Parametern wie fortgeschrittenem Tumorstadium, positivem Lymphknotenstadium sowie mit einem Rezidiv [284, 285]. Auch DCIS¹⁸-Patienten wiesen eine verringerte stromale CAV1-Expression auf, die mit der weiteren Progression und dem Übergang in einen invasiven Phänotyp des Brustkrebses korrelierte [286, 287]. So spielt stromales CAV1 vermutlich eine Rolle sowohl in der Tumorinitiation als auch der weiteren Entwicklung.

CAV1 ist ein möglicher Tumorsuppressor. So wiesen Wiechen et al. [288, 289] im Tumorgewebe des Ovars sowie in Sarkomen anhand immunhistochemischer Untersuchungen einen Verlust von CAV1 in tumorösen Epithelzellen nach, was einer möglichen Tumorsuppressorfunktion des CAV1 entsprechen würde. Diese Vermutung liegt nahe, da das Gen auf Chromosom 7q31.1 in einem Bereich lokalisiert ist, der häufig bei Tumoren von Niere, Brust, Prostata, Darm, Ovar und Pankreas sowie bei Sarkomen deletiert vorliegt [290-302]. Vor geraumer Zeit entwickelte Liscovitch et al. [303] eine Hypothese zur CAV1-Expression in der allgemeinen Tumorentwicklung, die jedoch CAV1 sowohl als Tumorsuppressor als auch Tumorpromotor beschreibt. Nach Liscovitchs Modell wird CAV1 in frühen Phasen der Tumorentwicklung nur in geringem Maße von epithelialen Zellen gebildet, wobei im Laufe der Progression bis hin zum Metastasierungsprozess die CAV1-Expression merklich ansteigt [303].

¹⁸ **DCIS:** Duktales Carcinoma in situ; Vorstufe des Brustkrebses, bei der Krebszellen die Basalmembran noch nicht durchbrochen haben (nicht invasiv, nicht infiltrativ, nicht zur Metastasenbildung fähig)

Dies hat eine Funktionsänderung des Moleküls zur Folge, das in dieser Phase vermutlich als Promotor zur Aufrechterhaltung der Überlebensfähigkeiten der Tumorzelle beiträgt [303-305]. Untersuchungen von Nasu et al. [306] zeigten zudem, dass die CAV1-Überexpression in der androgensensitiven Mauszelllinie ABAC3 zur Blockierung der durch Testosteronentzug induzierten Apoptose führt, was eine Tumorpromotorfunktion unterstreicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden beim Vergleich der gängigen Zelllinien LNCaP, PC-3 und DU-145 Unterschiede in der CAV1-Expression erkannt. Während die androgensensitive Zelllinie LNCaP (Lymphknotenmetastasen) keine CAV1-Expression aufwies, konnte in den androgeninsensitiven Zelllinien PC-3 (Metastasen des Knochenmarks) und DU-145 (Metastasen des Nervensystems) eine deutliche Expression nachgewiesen werden. Die nicht vorhandene CAV1-Expression in LNCaP-Zellen spiegelte sich bei der immunhistochemischen Analyse des Lymphknotenmetastasen-TMA wider. Tahir et al. [307] konnten allerdings eine Reexpression in hohen Passagen der LNCaP-Zellen mit reduzierter Androgenabhängigkeit nachweisen, was mit einer Sekretion des Proteins in das Zellkulturmedium verbunden war. In dieser Dissertation führte die Behandlung der LNCaP-Zelllinie mit Testosteron zu keinem messbaren Anstieg der CAV1-Transkriptmenge. Dies würde einer androgenabhängigen Expression dementsprechend widersprechen. Die Untersuchungen von Li et al. [308] zeigten zwar, dass Testosteron die CAV1-Expression zum Teil durch transkriptionelle Regulation erhöht, jedoch ist unklar, wie die Regulierung durch Androgene vollzogen wird.

Die permanente epitheliale Zelllinie BPH-1, die aus BPH-Gewebe isoliert wurde, zeigte in den hier vorgestellten Untersuchungen eine gut erkennbare CAV1-Expression und untermauert die Tumorsuppressorfunktion des Moleküls. Des Weiteren sind diese Beobachtungen kongruent mit den Resultaten immunhistochemischer Analysen von Gould et al. [309] an prostatistischen Gewebeschnitten, die in stromalen und epithelialen Bereichen von BPH-Arealen eine deutliche CAV1-Expression erkannten.

4.5 CAV1 in endothelialen Zellen

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erläutert, konnte CAV1 anhand immunhistochemischer Untersuchungen an prostatistischen Gewebeschnitten überwiegend in stromalen und vor allem in endothelialen Zellstrukturen lokalisiert werden. Die Expression in tumorösen Bereichen war im Vergleich zum tumorangrenzenden Normalgewebe in einer Untergruppe der Patienten geringer ausgeprägt. Die Vermutung liegt daher nahe, dass veränderte zelluläre Mechanismen zu einer differenziellen Expression des Proteins in endothelialen Zellen führen können.

Durch Ko-Kultivierungsversuche mit konditionierten Zellkulturüberständen verschiedener Zelltypen (PC-3, BPH-1, primäre Stromazellkulturen) konnte in der Endothelzelllinie HUVEC eine veränderte CAV1-Expression induziert werden. Während konditioniertes BPH-1-Medium keine Expressionsänderung hervorrief, bewirkte die Behandlung mit Zellkulturüberstand tumoröser Epithelzellen eine deutliche CAV1-Expressionsminderung in HUVEC-Zellen. In ähnlichem Maße führte die Behandlung mit Kulturüberständen von Stromazellen aus dem Tumor zu einer Reduzierung der endothelialen CAV1-Menge in der Hälfte der analysierten Ansätze. Dies untermauert die Hypothese eines parakrinen Wechselwirkungsmechanismus von durch Tumorzellen sezernierte Stoffe, die den CAV1-Bildungsprozess in Endothelzellen beeinflussen bzw. regulieren können.

Die separate Behandlung von HUVEC-Zellen mit drei verschiedenen Wachstumsfaktoren (VEGFA, bFGF, EGF) führte bei Behandlung mit VEGFA zu einer signifikanten Erhöhung der endothelialen CAV1-Expression. Im Gegenzug konnte zur Kontrolle bei Behandlung der HUVEC-Zellen mit VEGFA(-)-Kulturmedium der gegenteilige Effekt beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zur immunhistochemisch ermittelten verringerten endothelialen CAV1-Expression in den Tumorebenen von Gewebeschnitten (siehe 3.2.9) sowie der Herunterregulierung der endothelialen CAV1-Expression durch Behandlung mit konditionierten Zellkulturüberständen tumorösen Ursprungs (siehe 3.2.12). Die Zellkulturuntersuchungen zeigen zwar, dass die CAV1-Expression in Endothelzellen durch VEGFA beeinflusst wird, dieser angiogenetische Faktor jedoch als Regulator einer verminderten CAV1-Expression nicht infrage kommt. Andere Faktoren oder Kombinationen aus verschiedenen Faktoren sollten daher untersucht werden, die eine verminderte CAV1-Expression im Endothel verursachen könnten.

Untersuchungen von Liu et al. [310] demonstrierten eine signifikante Herunterregulierung des CAV1 in endothelialen ECV-304-Zellen nach VEGF-, bFGF- sowie HGF-Behandlung. Durch die Behandlung mit Angiogeneseinhibitoren konnte dieser Effekt dabei aufgehoben werden. Inwieweit die ECV-304-Zelllinie jedoch endothelialen Ursprungs ist, wurde aufgrund nachgewiesener Kreuzkontamination mit der humanen Blasenkarzinomzelllinie EJ1/T24 in den 1990er Jahren in Frage gestellt [311] und ist daher kritisch im Hinblick auf die genannten Ergebnisse zu betrachten. Des Weiteren wurde die Beeinflussung angiogenetischer Prozesse durch CAV1 in HUVEC-Zellen durch Tahir et al. [312] gezeigt. Die VEGF-stimulierte Autophosphorylierung des VEGFR2 wurde dabei durch CAV1-Knockdown signifikant reduziert und durch CAV1-Überexpression wieder hergestellt. Die Stimulierung durch VEGF induzierte zudem eine Translokation des CAV1 und des ko-lokalisierten VEGFR2 von der Plasmamembran ins Zytoplasma, was die Rolle von CAV1 in angiogenetischen Prozessen unterstreicht [312].

Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen der Gruppe um Thompson [313] ergaben, dass die CAV1-Expression auch in Prostatakarzinomzelllinien durch verschiedene Wachstumsfaktoren moduliert werden kann und zu einer Stimulierung der CAV1-Sekretion führt. Zusätzlich zeigten PC-3- und DU-145-Zellen nach CAV1-Knockdown verminderte VEGF-Mengen, bzw. bei CAV1-Überexpression in LNCaP-Zellen eine erhöhte Expression von VEGF und anderen Wachstumsfaktoren unter Involvierung des PI3K-Akt-Signalweges. Für CAV1 und spezifische tumorrelevante Wachstumsfaktoren wurde daher ein positiver autoregulatorischer Feedback-Mechanismus postuliert, indem CAV1 zu einer erhöhten mRNA-Stabilität von Wachstumsfaktoren führt. Diese kann wiederum die CAV1-Expression hochregulieren und somit das Überleben und die Invasion von prostatistischen Tumorzellen fördern [313].

4.6 CAV1 und dessen Einfluss auf die Metalloproteasen MMP2 und -9

Metalloproteasen stellen wichtige Modulatoren der extrazellulären Matrix dar, die in den extrazellulären Raum sezerniert oder auf der Membranoberfläche verankert werden und dort katalytisch aktiv sind. Zwei der 23 in Säugern identifizierten extrazellulären Endopeptidasen, MMP2 und MMP9, degradieren Typ VI Kollagen und sind beteiligt an Migrations- und Invasionsprozessen epithelialer Tumorzellen [314].

Kürzlich wiesen Han et al. [185] einen Zusammenhang der CAV1-Expression mit der Aktivität von Metalloproteasen bei Untersuchung von Tumorzellen der Bauchspeicheldrüse nach. Die Überexpression von CAV1 hatte dabei eine MMP2- und MMP9-Expressionsreduzierung auf mRNA- und Proteinebene zur Folge. Zudem zeigten CAV1-überexprimierende SW1990-Zellen reduziertes Zellinvasionspotenzial und verminderte MMP2- und MMP9-Aktivität in zymographischen Untersuchungen [185]. Eine Regulierung der Metalloprotease-Expressionen durch CAV1 konnte auch in Leberkarzinomzellen nachgewiesen werden [276]. Entgegen den Untersuchungen in der Bauchspeicheldrüse ergab hier die CAV1-Überexpression in HepG2-Zellen eine gesteigerte Migration und Invasion, sowie erhöhte Mengen an MMP2, MMP9 und VEGF [276]. Stark erhöhte Expressionen beider Metalloproteinasen ermittelten Sotgia et al. [315] im Mausmodell bei Analyse von CAV1-negativen epithelialen Brustzellen.

Obwohl in dieser Dissertation durch CAV1-Knockdown-Experimente sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene eine um durchschnittlich rund 60 % verringerte CAV1-Expression erreicht werden konnte, ließ sich keine Beeinflussung der untersuchten MMP2- bzw. MMP9-Aktivitäten feststellen. Ähnlich sah es nach Überexpression in LNCaP-Zellen aus. Auch hier bewirkte eine deutlich nachzuweisende Erhöhung des CAV1-Levels keine veränderte Aktivität der untersuchten

Metalloproteinasen. Es ist daher zu vermuten, dass CAV1 in MMP2- und MMP9-regulierten Migrations- und Invasionsprozessen hier eine eher untergeordnete Rolle spielt.

4.7 Methylierung im CAV1-Gen

In dieser Dissertation konnte anhand der durchgeführten Genexpressionsanalyse eine deutliche Verminderung der CAV1-mRNA im prostatistischen Tumorgewebe erkannt werden. Ein Grund für solch eine differenzielle Transkription könnten epigenetische Regulationsmechanismen darstellen, die zu einer Repression der Transkription und somit zu einer Herunterregulierung der mRNA-Menge führen.

Engelman et al. [178] wiesen in ihren Analysen auf zwei vorhandene CpG-Inseln im CAV1-Promotor und Exon 1 und 2 hin, die zu einer möglichen Regulierung der CAV1-Transkription befähigt sein könnten. Diese Vermutung wurde zudem anhand von Untersuchungen an CAV1-negativen Brustkrebszelllinien bestärkt [178]. In diesen Zellen wies der CAV1-Promotor eine starke Methylierung auf, die in normalen Brustepithelzellen nicht nachzuweisen war. Arai et al. [87] stellten zudem in einer Microarray-Studie nach Behandlung von Leberkarzinomzelllinien mit 5-Aza-2-desoxycytidin eine Hochregulierung von CAV1 fest, was einer expressionellen Beeinflussung durch epigenetische Modifikationen entspräche. Im Gegensatz zu diesen Studien konnte in Blasentumoren keine Methylierung im CAV1-Promotor nachgewiesen werden [316].

In der vorliegenden Dissertation konnten differenzielle Methylierungsmuster anhand der Bisulfit-Sequenzierung im Promotorbereich des CAV1-Gens bei Gegenüberstellung von malignem und korrespondierendem nicht-malignen Gewebe ermittelt werden, wobei die CAV1-Methylierung im Tumor zum Teil deutlich ausgeprägter war. Partielle Methylierung zeigte CAV1 auch in der MethylProfiler-Studie (3.1.4). Während die CpG-Dinukleotide CpG1 und CpG2 zwischen Tumor- und tumorangrenzendem Normalgewebe keine großen Unterschiede in ihrer Methylierung zeigten, konnte besonders ab CpG3 eine Zunahme der Methylierung im Tumorgewebe festgestellt werden (siehe 3.2.15). Die Schlussfolgerung liegt nahe, dass die Methylierung an diesen speziellen CpG-Dinukleotiden eine Rolle in der Expressionsregulierung spielt. Eine Identifizierung der CpG-Dinukleotide, die durch Methylierung maßgeblich an der Herunterregulierung von CAV1 beteiligt sind, konnte in den Reportergergen-Analysen aufgrund des starken Methylierungseffektes in vitro leider nicht erfolgen.

Die nicht vorhandene Methylierung im CAV1-Promotorbereich von BPH-1-Zellen ist vereinbar mit der gut detektierbaren Expression des Proteins, wohingegen LNCaP-Zellen vereinzelt methylierte CpG-Dinukleotide aufwiesen und das Protein nicht exprimierten. Gestützt

wird dieser Aspekt zusätzlich durch die identifizierte Reexpression des CAV1 nach Behandlung von LNCaP-Zellen mit dem Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2-desoxycytidin.

Während die Untersuchung einer zusätzlichen Genregion mit 17 weiteren CpG-Dinukleotiden in den Zelllinien analysiert werden konnte, war eine Verifizierung dieses Promotorareals in den paraffineingebetteten Archivgewebeproben nicht möglich, da die Amplifikation der Abschnitte nicht erfolgreich war. Interessant wäre eine weitere Evaluierung dieses Bereichs im Frischgewebe, um eventuell weitere relevante Cytosine mit regulatorischem Potenzial zu identifizieren.

Dass die Promotormethylierung bei der CAV1-Expressionsregulation eine Rolle spielen könnte, zeigen zudem verschiedene Arbeiten. So identifizierten Cui et al. [317] bei Analyse von Tumorgewebeproben aus 22 PCa-Patienten eine erhöhte Hypermethylierung in 90 % aller untersuchten Fälle. Weiterhin demonstrierten Sunaga et al. [179] im Lungenkarzinom, dass der Expressionsverlust des CAV1 signifikant mit der Promotorhypermethylierung verbunden war. Die Ergebnisse der von Bachmann et al. [274] veröffentlichten Studie, in der anhand der Untersuchung von gepaarten Proben eine erhöhte Methylierung im Tumor nachgewiesen wurde, entspricht den Resultaten dieser Dissertation und zeigt die Bedeutsamkeit der Methylierung als Regulationsmechanismus der CAV1-Expression beim Prostatakarzinom.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation stand die Suche nach neuen molekularen Biomarkern für das Prostatakarzinom, ihre Validierung und eventuelle funktionelle Rolle im Mittelpunkt der Untersuchungen. Die seit den 1980er Jahren durchgeführte Bestimmung der PSA-Konzentration im Serum kann zwar bei erhöhtem Wert Hinweise auf eine mögliche Krebserkrankung geben, ist im Hinblick einer auch bei anderen Veränderungen und Krankheiten des Organs vorkommende Erhöhung jedoch mit Vorsicht zu betrachten. Neue Marker zur Bestimmung und Abschätzung von Diagnose und Prognose sind daher zwingend erforderlich, um eine „Über“-Diagnose und „Über“-Behandlung vermeiden zu helfen.

Da die epigenetische Hypermethylierung von Genpromotoren eine wichtige Rolle in der frühen Krebsentwicklung spielt, wurde diese als möglicher Marker für das Prostatakarzinom untersucht. Hierfür wurde an archiviertem Gewebe von 25 Patienten der Methylierungseffekt von vier Genen (GSTP1, APC, RAR β 2, PITX2) untersucht. Gewebeproben aus Tumorarealen, sowie Gewebeproben aus histologisch normal erscheinendem, tumorangrenzendem Gewebe wurden entnommen und die ermittelten Methylierungsanteile der jeweiligen Gene beurteilt. Dabei konnte eine erhöhte Methylierung in den Tumorproben für jedes untersuchte Gen gefunden werden. Speziell GSTP1 scheint sich als diagnostischer Marker sehr gut zu eignen, da nur die Tumorproben eine erhöhte Methylierung aufwiesen.

Ein Methylierungseffekt, der sich in einer erhöhten Methylierung im tumorangrenzenden Normalgewebe manifestiert, konnte bei über der Hälfte der untersuchten Patienten am RAR β 2-Promotor erkannt werden. Dieses Gen zeigte das größte Potenzial, als Marker für das Vorhandensein eines Karzinoms trotz tumorfreier Gewebestanzbiopsien zu fungieren. In einer aus 50 Patienten bestehenden Validierungskohorte konnte dieses Erkenntnis untermauert werden. Darüber hinaus korrelierte die Hypermethylierung des GSTP1-, APC- und RAR β 2-Gens mit Parametern der Progression (pT-Stadium und/oder primärer Gleason-Grad), was die Bedeutung der Hypermethylierung weiter verdeutlicht.

Die Durchführung einer MethylProfiler-Studie ergab Hinweise auf zusätzliche Gene mit differenzieller Promotormethylierung zwischen Tumor- und tumorangrenzendem Normalgewebe. Zu nennen sind hier besonders die Gene ZNF185, MSX1, RASSF1 und GPX3, die hochmethylierte Anteile sowohl im Tumor als auch, meist in geringerem Maße, im tumorangrenzenden Normalgewebe aufwiesen. Intermediäre Methylierung konnte zudem überwiegend in den Genpromotoren von TIMP2 und dem endothelialen Faktor CAV1 erkannt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Untersuchung angiogenetischer Faktoren beim Prostatakarzinom. Die Angiogenese stellt einen wichtigen Aspekt zur Beurteilung der Tumorentwicklung dar, ohne die ein Wachstum ab einer bestimmten TumorgroÙe nicht mehr möglich wäre. Endothel-assoziierte Faktoren sollten aufgrund der Zunahme der BlutgefäÙe einen direkten Zusammenhang zur Angiogenese geben. Das Potenzial der ausgewählten Faktoren (CD31, CD34, CD105, CD144, CD146, VEGFA, VEGFR2, CAV1), als Marker der PCa-Progression wurde daher anhand von Genexpressionsanalysen mittels der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) an einer ausgewählten Patientenkohorte (69 Fälle) untersucht.

Die Mehrzahl der untersuchten endothelialen Faktoren wies kaum Änderungen in ihren Expressionen bei Vergleich von Tumor- und gepaartem tumorangrenzenden Normalgewebe auf. CAV1 zeigte jedoch in über 90 % der Proben eine signifikante Herunterregulierung der mRNA-Expression im Tumor (Fold Change=-1.89). Zusätzlich korrelierte die CAV1-mRNA-Expression invers mit pathologischen Parametern wie pT-Stadium oder Gleason Score. Prognostisch ergaben sich ebenso Zusammenhänge, da nach Dichotomisierung anhand des Medians alle untersuchten Fälle mit geringerer CAV1-Expression ein signifikant schlechteres Rezidiv-freies Überleben aufwiesen als die Fälle, die eine höhere CAV1-Expression zeigten.

Eine epigenetische Stummschaltung der Expression auf DNA-Ebene könnte eine mögliche Ursache für diese verringerte Transkriptmenge im Tumor darstellen. Zu deren Nachweis wurde in dieser Arbeit die Methylierung von sieben CpG-Dinukleotiden des CAV1-Promotorbereiches mittels der Bisulfit-Sequenzierung untersucht. Die Analyse von Tumor- und tumorangrenzendem Normalgewebe von sechs Patienten im Vergleich zeigte in 5/6 Fällen differenzielle Methylierungsmuster auf. Von diesen wies ein untersuchter Fall eine etwas geringere tumoröse Gesamtmethylierung auf, während die untersuchten CpG-Dinukleotide im Tumorgewebe der restlichen vier Fälle deutlich häufiger methyliert vorlagen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich die Methylierungsmuster im CAV1-Promotor zwischen Normal- und Tumorgewebe unterscheiden, wodurch eine Regulierung der Genexpression zustande kommen könnte. Inwieweit die Methylierung hierbei eine Hauptrolle spielt, wäre in weiteren Untersuchungen zu klären. Dass die DNA-Methylierung als Regulator der CAV1-Genexpression fungieren kann, konnte anhand von Experimenten an der CAV1-defizienten Prostatakrebszelllinie LNCaP gezeigt werden. Die Behandlung mit der demethylierenden Substanz 5-Aza-2-desoxycytidin über zwei Wochen führte dabei zu einer CAV1-Reexpression in LNCaP-Zellen auf mRNA-Ebene.

Immunhistochemisch konnte CAV1 überwiegend in stromalen Bereichen lokalisiert werden, wobei eine Untergruppe der Patienten (12/64) eine deutlich verringerte CAV1-Proteinexpression im tumoralen Stroma und im Endothel aufwiesen. Anhand von Ko-

Kultivierungsversuchen mit PC-3-konditioniertem Zellkulturüberstand und Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) konnte ein Einfluss auf die endotheliale CAV1-Proteinexpression gezeigt werden, da diese deutlich verringert war. Des Weiteren wurde dies auch durch die Behandlung mit konditioniertem Stromazellkulturüberstand tumorösen Ursprungs hervorgerufen. Dies bestätigt die immunhistochemischen Resultate und lässt auf parakrine Wirkmechanismen schließen. Die Gabe von VEGFA in vitro ergab eine signifikante CAV1-Proteinerhöhung in HUVEC-Zellen. Andere Faktoren oder Faktorkombinationen sind daher zu untersuchen, die für eine CAV1-Herunterregulierung in Endothelzellen verantwortlich sein könnten. Nichtsdestotrotz weisen die Resultate auf eine mögliche Rolle des CAV1 in angiogenetischen Prozessen hin.

In weiteren Analysen konnte kein Einfluss von CAV1 auf die MMP2- und MMP9-Aktivitäten in Zellkulturüberständen prostaticher Tumorzelllinien nach erfolgreicher CAV1-Überexpression bzw. CAV1-Knockdown gefunden werden, was eine mögliche Funktion des Proteins in MMP2- bzw. MMP9-regulierten Prozessen eher ausschließt.

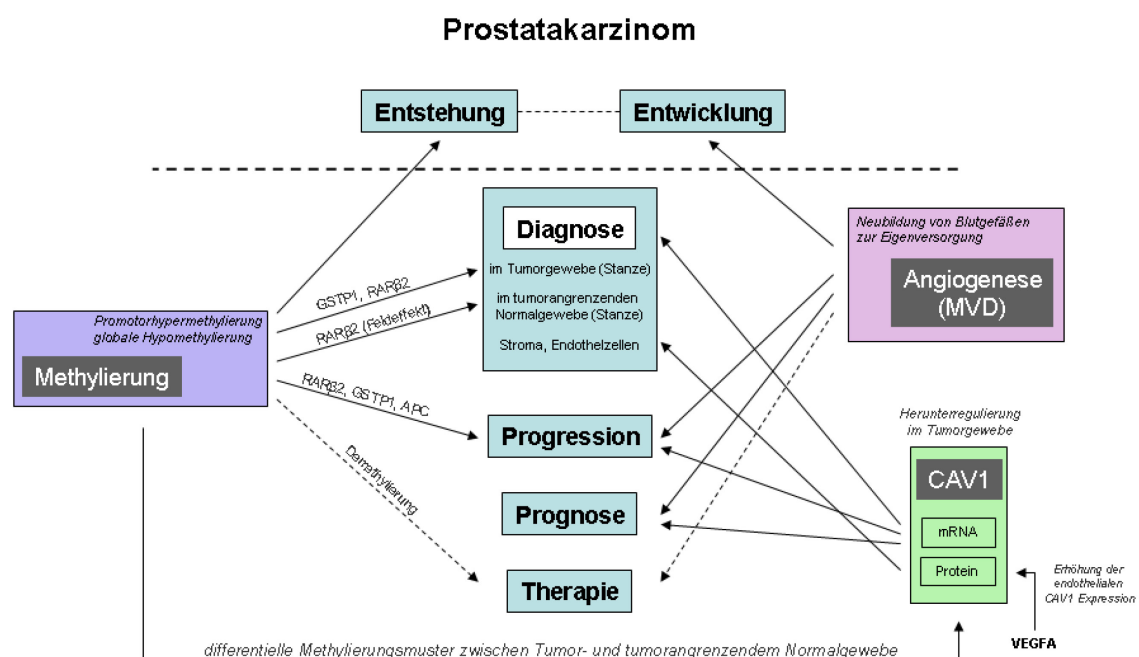


Abb. 5-1: Einordnung der epigenetischen Methylierung, der Mikrogefäßdichte (MVD) sowie des CAV1 im Kontext ihres Markerpotenzials beim Prostatakarzinom.

Neben den Genexpressionsanalysen Endothel-assoziiierter Faktoren wurde die Mikrogefäßdichte als potenzieller Marker der PCa-Progression am Tissue-Mikroarray untersucht. Die anhand der immunhistochemischen Markierung von CD31- bzw. CD34-positiven Gefäßen

ermittelte MVD korrelierte hierbei mit dem pT-Stadium und dem Gleason Score und ist daher zur Bestimmung der Progression beim Prostatakarzinom geeignet. Darüber hinaus korrelierte die Anzahl CD31-positiver Mikrogefäße signifikant mit der Anzahl der CD34-markierten Gefäße, was die Nutzbarkeit beider Faktoren als Endothelzellmarker beim prostatistischen Tumor unterstreicht.

Abb. 5-1 zeigt eine zusammenfassende Übersicht der in dieser Dissertation untersuchten Schwerpunkte im Kontext ihrer möglichen Einsetzbarkeit als Marker des Prostatakarzinoms. Epigenetik und Angiogenese sind wichtige Prozesse in der Tumorentstehung und –entwicklung. Durch Zuhilfenahme der neu gewonnenen Erkenntnisse könnte die oft schwierige diagnostische und prognostische Beurteilung des Prostatakarzinoms aufgrund seiner multifokalen Erscheinungsformen, besonders im Hinblick auf die Beurteilung von Gewebestanzbiopsien, verbessert werden, um so dem Patienten eine gezieltere Behandlung zu ermöglichen.

6 Literaturverzeichnis

1. McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* 1988;12:619-633.
2. Helpap B. Future directions in research of prostate carcinoma. *Pathol Res Pract* 1993;189:497-509.
3. Aumuller G. Morphologic and regulatory aspects of prostatic function. *Anat Embryol (Berl)* 1989;179:519-531.
4. Hedrick L, Epstein JI. Use of keratin 903 as an adjunct in the diagnosis of prostate carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1989;13:389-396.
5. Bonkhoff H, Remberger K. Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate* 1996;28:98-106.
6. Chatterjee B. The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Mol Cell Biochem* 2003;253:89-101.
7. Aprikian AG, Cordon-Cardo C, Fair WR, Reuter VE. Characterization of neuroendocrine differentiation in human benign prostate and prostatic adenocarcinoma. *Cancer* 1993;71:3952-3965.
8. McNeal JE. Anatomy of the prostate: an historical survey of divergent views. *Prostate* 1980;1:3-13.
9. <http://www.leben-mit-prostatatrebs.de/medizinisches-wissen/krankheitsbild/uebersicht/article-die-prostata--anatomie-und-funktion-64525.html>. 2011.
10. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240:889-895.
11. Beato M, Chalepakis G, Schauer M, Slater EP. DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem* 1989;32:737-747.
12. Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* 1987;8:338-362.
13. Cunha GR. Growth factors as mediators of androgen action during male urogenital development. *Prostate Suppl* 1996;6:22-25.
14. Levine AC, Liu XH, Greenberg PD, Eliashvili M et al. Androgens induce the expression of vascular endothelial growth factor in human fetal prostatic fibroblasts. *Endocrinology* 1998;139:4672-4678.
15. Kaminski A, Hahne JC, Haddouti e, Florin A et al. Tumour-stroma interactions between metastatic prostate cancer cells and fibroblasts. *Int J Mol Med* 2006;18:941-950.
16. Guess HA. Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Epidemiol Rev* 2001;23:152-158.
17. Epstein JI. Precursor lesions to prostatic adenocarcinoma. *Virchows Arch* 2009;454:1-16.
18. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
19. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE et al. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 1987;317:909-916.
20. Hilz H. [Molecular forms of prostate-specific antigen and their clinical significance]. *Urologe A* 1995;34:275-282.

21. DGU. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. 2009.
22. Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1228-1242.
23. Jocham D, Miller K. Praxis der Urologie, Band 2, 3 ed.: Thieme Verlag, Stuttgart; 2007.
24. Shannon BA, McNeal JE, Cohen RJ. Transition zone carcinoma of the prostate gland: a common indolent tumour type that occasionally manifests aggressive behaviour. *Pathology* 2003;35:467-471.
25. Han M, Snow PB, Epstein JI, Chan TY et al. A neural network predicts progression for men with gleason score 3+4 versus 4+3 tumors after radical prostatectomy. *Urology* 2000;56:994-999.
26. Tolonen TT, Kujala PM, Tammela TL, Tuominen VJ et al. Overall and worst gleason scores are equally good predictors of prostate cancer progression. *BMC Urol* 2011;11:21.
27. Sobin L, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours, 6 ed. New York: John Wiley& Sons; 2002.
28. Parker C. Active surveillance: towards a new paradigm in the management of early prostate cancer. *Lancet Oncol* 2004;5:101-106.
29. Heisler LE, Evangelou A, Lew AM, Trachtenberg J et al. Androgen-dependent cell cycle arrest and apoptotic death in PC-3 prostatic cell cultures expressing a full-length human androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1997;126:59-73.
30. Clark JA, Wray NP, Ashton CM. Living with treatment decisions: regrets and quality of life among men treated for metastatic prostate cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:72-80.
31. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:34-45.
32. Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML et al. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res* 1995;55:4438-4445.
33. Shiota M, Yokomizo A, Naito S. Increased androgen receptor transcription: a cause of castration-resistant prostate cancer and a possible therapeutic target. *J Mol Endocrinol* 2011;47:R25-R41.
34. Dutt SS, Gao AC. Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression. *Future Oncol* 2009;5:1403-1413.
35. Brown MW, Brooks JP, Albert PS, Poggi MM. An analysis of erectile function after intensity modulated radiation therapy for localized prostate carcinoma. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2007;10:189-193.
36. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979;17:159-163.
37. Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP et al. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. *Cancer Res* 1980;40:2428-2432.
38. Rao AR, Motiwala HG, Karim OM. The discovery of prostate-specific antigen. *BJU Int* 2008;101:5-10.

39. Sandhu JS. Management of elevated prostate-specific antigen in men with nonbacterial chronic prostatitis. *Curr Urol Rep* 2009;10:302-306.
40. Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* 2009;360:1320-1328.
41. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, III, Buys SS et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* 2009;360:1310-1319.
42. Hugosson J, Carlsson S, Aus G, Bergdahl S et al. Mortality results from the Goteborg randomised population-based prostate-cancer screening trial. *Lancet Oncol* 2010;11:725-732.
43. Sandblom G, Varenhorst E, Rosell J, Lofman O et al. Randomised prostate cancer screening trial: 20 year follow-up. *BMJ* 2011;342:d1539.
44. Gjertson CK, Albertsen PC. Use and assessment of PSA in prostate cancer. *Med Clin North Am* 2011;95:191-200.
45. DGU. Leitlinie zur PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik. *Der Urologe A* 2002;41:509-513.
46. Bussemakers MJ, van BA, Verhaegh GW, Smit FP et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 1999;59:5975-5979.
47. de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D et al. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res* 2002;62:2695-2698.
48. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van O, I, Karthaus HF et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 2003;44:8-15.
49. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:245-254.
50. Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol* 2004;14:427-432.
51. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-428.
52. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999;21:163-167.
53. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-2054.
54. Foley DL, Craig JM, Morley R, Olsson CA et al. Prospects for epigenetic epidemiology. *Am J Epidemiol* 2009;169:389-400.
55. Daniel FI, Cherubini K, Yurgel LS, de Figueiredo MA et al. The role of epigenetic transcription repression and DNA methyltransferases in cancer. *Cancer* 2011;117:677-687.
56. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 1999;274:33002-33010.
57. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247-257.
58. Ng HH, Bird A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:158-163.

59. Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 2001;20:3139-3155.
60. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.
61. Gonzalo S. Epigenetic alterations in aging. *J Appl Physiol* 2010;109:586-597.
62. Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 2001;10:3001-3007.
63. Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 1980;8:1499-1504.
64. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 1982;10:2709-2721.
65. Ehrlich M, Wang RY. 5-Methylcytosine in eukaryotic DNA. *Science* 1981;212:1350-1357.
66. Shen L, Waterland RA. Methods of DNA methylation analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:576-581.
67. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986;321:209-213.
68. Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW et al. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* 1991;48:880-888.
69. Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2005;5:223-231.
70. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 1998;18:6538-6547.
71. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 2008;9:465-476.
72. Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 2005;37:853-862.
73. Kaneda A, Tsukamoto T, Takamura-Enya T, Watanabe N et al. Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. *Cancer Sci* 2004;95:58-64.
74. Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG et al. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 2006;125:301-313.
75. Holm TM, Jackson-Grusby L, Brambrink T, Yamada Y et al. Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice. *Cancer Cell* 2005;8:275-285.
76. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997;13:335-340.
77. Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol* 1999;9:349-357.
78. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR et al. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 1994;7:536-540.

79. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002;21:5427-5440.
80. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;6:963-968.
81. Vauthey JN, Walsh GL, Vlastos G, Lauwers GY. Importance of field cancerisation in clinical oncology. *Lancet Oncol* 2000;1:15-16.
82. Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, Mizokami M et al. Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis--A comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and DNA hypermethylation on 8 CpG islands in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;32:970-979.
83. Eads CA, Lord RV, Kurumboor SK, Wickramasinghe K et al. Fields of aberrant CpG island hypermethylation in Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 2000;60:5021-5026.
84. Guo M, House MG, Hooker C, Han Y et al. Promoter hypermethylation of resected bronchial margins: a field defect of changes? *Clin Cancer Res* 2004;10:5131-5136.
85. Hsieh CJ, Klump B, Holzmann K, Borchard F et al. Hypermethylation of the p16INK4a promoter in colectomy specimens of patients with long-standing and extensive ulcerative colitis. *Cancer Res* 1998;58:3942-3945.
86. Yan PS, Venkataramu C, Ibrahim A, Liu JC et al. Mapping geographic zones of cancer risk with epigenetic biomarkers in normal breast tissue. *Clin Cancer Res* 2006;12:6626-6636.
87. Arai M, Yokosuka O, Hirasawa Y, Fukai K et al. Sequential gene expression changes in cancer cell lines after treatment with the demethylation agent 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Cancer* 2006;106:2514-2525.
88. Nakayama M, Gonzalgo ML, Yegnasubramanian S, Lin X et al. GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular biomarker for prostate cancer. *J Cell Biochem* 2004;91:540-552.
89. Suh CI, Shanafelt T, May DJ, Shroyer KR et al. Comparison of telomerase activity and GSTP1 promoter methylation in ejaculate as potential screening tests for prostate cancer. *Mol Cell Probes* 2000;14:211-217.
90. Santourlidis S, Florl A, Ackermann R, Wirtz HC et al. High frequency of alterations in DNA methylation in adenocarcinoma of the prostate. *Prostate* 1999;39:166-174.
91. Cowell IG, Dixon KH, Pemble SE, Ketterer B et al. The structure of the human glutathione S-transferase pi gene. *Biochem J* 1988;255:79-83.
92. Morrow CS, Cowan KH, Goldsmith ME. Structure of the human genomic glutathione S-transferase-pi gene. *Gene* 1989;75:3-11.
93. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995;30:445-600.
94. Brooks JD, Weinstein M, Lin X, Sun Y et al. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:531-536.

95. Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3410-3415.
96. Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E et al. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* 1998;58:4515-4518.
97. Nelson WG, De Marzo AM, Deweese TL, Lin X et al. Preneoplastic prostate lesions: an opportunity for prostate cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 2001;952:135-144.
98. Lin X, Tascilar M, Lee WH, Vles WJ et al. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol* 2001;159:1815-1826.
99. Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 1987;330:444-450.
100. Youssef EM, Estecio MR, Issa JP. Methylation and regulation of expression of different retinoic acid receptor beta isoforms in human colon cancer. *Cancer Biol Ther* 2004;3:82-86.
101. Zelent A, Mendelsohn C, Kastner P, Krust A et al. Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J* 1991;10:71-81.
102. Castillo L, Milano G, Santini J, Demard F et al. Analysis of retinoic acid receptor beta expression in normal and malignant laryngeal mucosa by a sensitive and routine applicable reverse transcription-polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay method. *Clin Cancer Res* 1997;3:2137-2142.
103. Picard E, Seguin C, Monhoven N, Rochette-Egly C et al. Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1059-1066.
104. Widschwendter M, Berger J, Daxenbichler G, Muller-Holzner E et al. Loss of retinoic acid receptor beta expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. *Cancer Res* 1997;57:4158-4161.
105. Xu XC, Sozzi G, Lee JS, Lee JJ et al. Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:624-629.
106. Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 2002;295:1079-1082.
107. Sirchia SM, Ren M, Pili R, Sironi E et al. Endogenous reactivation of the RARbeta2 tumor suppressor gene epigenetically silenced in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:2455-2461.
108. Widschwendter M, Berger J, Muller HM, Zeimet AG et al. Epigenetic downregulation of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6:193-201.
109. Wang JS, Guo M, Montgomery EA, Thompson RE et al. DNA promoter hypermethylation of p16 and APC predicts neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2009;104:2153-2160.
110. Lee BB, Lee EJ, Jung EH, Chun HK et al. Aberrant methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and Wif-1 genes in plasma as a biomarker for early detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:6185-6191.

111. Ignatov A, Bischoff J, Ignatov T, Schwarzenau C et al. APC promoter hypermethylation is an early event in endometrial tumorigenesis. *Cancer Sci* 2010;101:321-327.
112. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
113. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281:1509-1512.
114. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422-426.
115. Dahmani R, Just PA, Perret C. The Wnt/beta-catenin pathway as a therapeutic target in human hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011.
116. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;361:2449-2460.
117. Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000;60:4366-4371.
118. Jin Z, Tamura G, Tsuchiya T, Sakata K et al. Adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter hypermethylation in primary breast cancers. *Br J Cancer* 2001;85:69-73.
119. Sarrio D, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sanchez-Estevéz C et al. Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. *Int J Cancer* 2003;106:208-215.
120. Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez dC, I, Al-Saleem T et al. Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:6189-6193.
121. Bastian PJ, Ellinger J, Wellmann A, Wernert N et al. Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci. *Clin Cancer Res* 2005;11:4097-4106.
122. Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 2004;202:233-240.
123. Henrique R, Ribeiro FR, Fonseca D, Hoque MO et al. High promoter methylation levels of APC predict poor prognosis in sextant biopsies from prostate cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13:6122-6129.
124. Weiss G, Cottrell S, Distler J, Schatz P et al. DNA methylation of the PITX2 gene promoter region is a strong independent prognostic marker of biochemical recurrence in patients with prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 2009;181:1678-1685.
125. Kioussi C, Briata P, Baek SH, Rose DW et al. Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell* 2002;111:673-685.
126. Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO, Jair KW et al. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:2823-2829.
127. Maier S, Nimmrich I, Koenig T, Eppenberger-Castori S et al. DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients--Technical and clinical validation in a multi-centre setting in collaboration with the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PathoBiology group. *Eur J Cancer* 2007;43:1679-1686.

128. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004;429:457-463.
129. Fandy TE. Development of DNA methyltransferase inhibitors for the treatment of neoplastic diseases. *Curr Med Chem* 2009;16:2075-2085.
130. Marquez VE, Kelley JA, Agbaria R, Ben-Kasus T et al. Zebularine: a unique molecule for an epigenetically based strategy in cancer chemotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1058:246-254.
131. Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z et al. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res* 2003;63:7563-7570.
132. Chuang JC, Yoo CB, Kwan JM, Li TW et al. Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Cancer Ther* 2005;4:1515-1520.
133. Klisovic RB, Stock W, Cataland S, Klisovic MI et al. A phase I biological study of MG98, an oligodeoxynucleotide antisense to DNA methyltransferase 1, in patients with high-risk myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2008;14:2444-2449.
134. Siedlecki P, Garcia BR, Musch T, Brueckner B et al. Discovery of two novel, small-molecule inhibitors of DNA methylation. *J Med Chem* 2006;49:678-683.
135. Mai A, Altucci L. Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:199-213.
136. Gimbrone MA, Jr., Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 1972;136:261-276.
137. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8.
138. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1875-1887.
139. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993;143:401-409.
140. Bono AV, Celato N, Cova V, Salvatore M et al. Microvessel density in prostate carcinoma. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2002;5:123-127.
141. Krupski T, Petroni GR, Frierson HF, Jr., Theodorescu JU. Microvessel density, p53, retinoblastoma, and chromogranin A immunohistochemistry as predictors of disease-specific survival following radical prostatectomy for carcinoma of the prostate. *Urology* 2000;55:743-749.
142. Erbersdobler A, Fritz H, Schnoger S, Graefen M et al. Tumour grade, proliferation, apoptosis, microvessel density, p53, and bcl-2 in prostate cancers: differences between tumours located in the transition zone and in the peripheral zone. *Eur Urol* 2002;41:40-46.
143. Silberman MA, Partin AW, Veltri RW, Epstein JI. Tumor angiogenesis correlates with progression after radical prostatectomy but not with pathologic stage in Gleason sum 5 to 7 adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1997;79:772-779.
144. Rubin MA, Buyyounouski M, Bagiella E, Sharir S et al. Microvessel density in prostate cancer: lack of correlation with tumor grade, pathologic stage, and clinical outcome. *Urology* 1999;53:542-547.

145. Taverna G, Colombo P, Grizzi F, Franceschini B et al. Fractal analysis of two-dimensional vascularity in primary prostate cancer and surrounding non-tumoral parenchyma. *Pathol Res Pract* 2009;205:438-444.
146. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:273-286.
147. Newman PJ. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 1997;99:3-8.
148. Satterthwaite AB, Burn TC, Le Beau MM, Tenen DG. Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics* 1992;12:788-794.
149. Arakawa A, Soh S, Chakraborty S, Scardino PT et al. Prognostic significance of angiogenesis in clinically localized prostate cancer (staining for Factor VIII-related antigen and CD34 Antigen. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 1997;1:32-38.
150. Bigler SA, Deering RE, Brawer MK. Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum Pathol* 1993;24:220-226.
151. Bettencourt MC, Bauer JJ, Sesterhenn IA, Connelly RR et al. CD34 immunohistochemical assessment of angiogenesis as a prognostic marker for prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Urol* 1998;160:459-465.
152. Warrington K, Hillarby MC, Li C, Letarte M et al. Functional role of CD105 in TGF-beta1 signalling in murine and human endothelial cells. *Anticancer Res* 2005;25:1851-1864.
153. Harris ES, Nelson WJ. VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:651-658.
154. Bardin N, Anfosso F, Masse JM, Cramer E et al. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood* 2001;98:3677-3684.
155. Sers C, Kirsch K, Rothbacher U, Riethmuller G et al. Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8514-8518.
156. Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2008;73:751-762.
157. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:469-478.
158. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E. *Endothelium* 2006;13:63-69.
159. Kabrun N, Buhning HJ, Choi K, Ullrich A et al. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* 1997;124:2039-2048.
160. Samaranayake H, Maatta AM, Pikkarainen J, Yla-Herttuala S. Future prospects and challenges of antiangiogenic cancer gene therapy. *Hum Gene Ther* 2010;21:381-396.
161. Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:185-194.
162. Quest AF, Leyton L, Parraga M. Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem Cell Biol* 2004;82:129-144.
163. Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I et al. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:131-135.

164. Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA et al. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* 1997;272:29337-29346.
165. Way M, Parton RG. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett* 1995;376:108-112.
166. Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K et al. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 1996;271:2255-2261.
167. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 2001;293:2449-2452.
168. Galbiati F, Engelman JA, Volonte D, Zhang XL et al. Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J Biol Chem* 2001;276:21425-21433.
169. van Golen KL. Is caveolin-1 a viable therapeutic target to reduce cancer metastasis? *Expert Opin Ther Targets* 2006;10:709-721.
170. Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996;271:29182-29190.
171. Di Vizio D, Adam RM, Kim J, Kim R et al. Caveolin-1 interacts with a lipid raft-associated population of fatty acid synthase. *Cell Cycle* 2008;7:2257-2267.
172. Li L, Ren CH, Tahir SA, Ren C et al. Caveolin-1 maintains activated Akt in prostate cancer cells through scaffolding domain binding site interactions with and inhibition of serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A. *Mol Cell Biol* 2003;23:9389-9404.
173. Yang G, Addai J, Wheeler TM, Frolov A et al. Correlative evidence that prostate cancer cell-derived caveolin-1 mediates angiogenesis. *Hum Pathol* 2007;38:1688-1695.
174. Llorente A, de Marco MC, Alonso MA. Caveolin-1 and MAL are located on prostasomes secreted by the prostate cancer PC-3 cell line. *J Cell Sci* 2004;117:5343-5351.
175. Tahir SA, Yang G, Goltsov AA, Watanabe M et al. Tumor cell-secreted caveolin-1 has proangiogenic activities in prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68:731-739.
176. Joo HJ, Oh DK, Kim YS, Lee KB et al. Increased expression of caveolin-1 and microvessel density correlates with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int* 2004;93:291-296.
177. Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett* 1998;436:403-410.
178. Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Lett* 1999;448:221-230.
179. Sunaga N, Miyajima K, Suzuki M, Sato M et al. Different roles for caveolin-1 in the development of non-small cell lung cancer versus small cell lung cancer. *Cancer Res* 2004;64:4277-4285.

180. Janssen M, Albrecht M, Moschler O, Renneberg H et al. Cell lineage characteristics of human prostatic stromal cells cultured in vitro. *Prostate* 2000;43:20-30.
181. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 1994;22:2990-2997.
182. Giltneane JM, Rimm DL. Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology. *Nat Clin Pract Oncol* 2004;1:104-111.
183. Steiner I, Jung K, Schatz P, Horns T et al. Gene promoter methylation and its potential relevance in early prostate cancer diagnosis. *Pathobiology* 2010;77:260-266.
184. Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C et al. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med (Berl)* 2005;83:1014-1024.
185. Han F, Zhu HG. Caveolin-1 regulating the invasion and expression of matrix metalloproteinase (MMPs) in pancreatic carcinoma cells. *J Surg Res* 2010;159:443-450.
186. Zou CP, Youssef EM, Zou CC, Carey TE et al. Differential effects of chromosome 3p deletion on the expression of the putative tumor suppressor RAR beta and on retinoid resistance in human squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2001;20:6820-6827.
187. Pappas JJ, Toulouse A, Hebert J, Fetni R et al. Allelic methylation bias of the RARB2 tumor suppressor gene promoter in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:978-993.
188. Nakayama T, Watanabe M, Yamanaka M, Hirokawa Y et al. The role of epigenetic modifications in retinoic acid receptor beta2 gene expression in human prostate cancers. *Lab Invest* 2001;81:1049-1057.
189. Yamanaka M, Watanabe M, Yamada Y, Takagi A et al. Altered methylation of multiple genes in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer* 2003;106:382-387.
190. Zhang J, Liu L, Pfeifer GP. Methylation of the retinoid response gene TIG1 in prostate cancer correlates with methylation of the retinoic acid receptor beta gene. *Oncogene* 2004;23:2241-2249.
191. Florl AR, Steinhoff C, Muller M, Seifert HH et al. Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. *Br J Cancer* 2004;91:985-994.
192. Mehrotra J, Varde S, Wang H, Chiu H et al. Quantitative, spatial resolution of the epigenetic field effect in prostate cancer. *Prostate* 2008;68:152-160.
193. Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL, Epstein JI et al. Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol* 2003;163:923-933.
194. Goessl C, Krause H, Muller M, Heicappell R et al. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res* 2000;60:5941-5945.
195. Rabiau N, Thiam MO, Satih S, Guy L et al. Methylation analysis of BRCA1, RASSF1, GSTP1 and EPHB2 promoters in prostate biopsies according to different degrees of malignancy. *In Vivo* 2009;23:387-391.
196. Hanson JA, Gillespie JW, Grover A, Tangrea MA et al. Gene promoter methylation in prostate tumor-associated stromal cells. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:255-261.

197. Richiardi L, Fiano V, Vizzini L, De ML et al. Promoter methylation in APC, RUNX3, and GSTP1 and mortality in prostate cancer patients. *J Clin Oncol* 2009;27:3161-3168.
198. Zhou M, Tokumaru Y, Sidransky D, Epstein JI. Quantitative GSTP1 methylation levels correlate with Gleason grade and tumor volume in prostate needle biopsies. *J Urol* 2004;171:2195-2198.
199. Cho NY, Kim BH, Choi M, Yoo EJ et al. Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features. *J Pathol* 2007;211:269-277.
200. Daniunaite K, Berezniakovas A, Jankevicius F, Laurinavicius A et al. Frequent methylation of RASSF1 and RARB in urine sediments from patients with early stage prostate cancer. *Medicina (Kaunas)* 2011;47:147-153.
201. Kwabi-Addo B, Chung W, Shen L, Ittmann M et al. Age-related DNA methylation changes in normal human prostate tissues. *Clin Cancer Res* 2007;13:3796-3802.
202. Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, Zheng S et al. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet* 2009;5:e1000602.
203. Wilson VL, Smith RA, Ma S, Cutler RG. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J Biol Chem* 1987;262:9948-9951.
204. Lopatina N, Haskell JF, Andrews LG, Poole JC et al. Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. *J Cell Biochem* 2002;84:324-334.
205. Casillas MA, Jr., Lopatina N, Andrews LG, Tollefsbol TO. Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 2003;252:33-43.
206. Zhang JS, Gong A, Young CY. ZNF185, an actin-cytoskeleton-associated growth inhibitory LIM protein in prostate cancer. *Oncogene* 2007;26:111-122.
207. Bach I. The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev* 2000;91:5-17.
208. McLoughlin P, Ehler E, Carlile G, Licht JD et al. The LIM-only protein DRAL/FHL2 interacts with and is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem* 2002;277:37045-37053.
209. Mousses S, Bubendorf L, Wagner U, Hostetter G et al. Clinical validation of candidate genes associated with prostate cancer progression in the CWR22 model system using tissue microarrays. *Cancer Res* 2002;62:1256-1260.
210. Vanaja DK, Cheville JC, Iturria SJ, Young CY. Transcriptional silencing of zinc finger protein 185 identified by expression profiling is associated with prostate cancer progression. *Cancer Res* 2003;63:3877-3882.
211. Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 1994;78:191-201.
212. Morgan BA, Izpisua-Belmonte JC, Duboule D, Tabin CJ. Targeted misexpression of Hox-4.6 in the avian limb bud causes apparent homeotic transformations. *Nature* 1992;358:236-239.
213. Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ et al. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol* 2005;205:154-171.

214. Maroulakou IG, Spyropoulos DD. The study of HOX gene function in hematopoietic, breast and lung carcinogenesis. *Anticancer Res* 2003;23:2101-2110.
215. Takahashi C, Akiyama N, Matsuzaki T, Takai S et al. Characterization of a human MSX-2 cDNA and its fragment isolated as a transformation suppressor gene against v-Ki-ras oncogene. *Oncogene* 1996;12:2137-2146.
216. Shim C, Zhang W, Rhee CH, Lee JH. Profiling of differentially expressed genes in human primary cervical cancer by complementary DNA expression array. *Clin Cancer Res* 1998;4:3045-3050.
217. Shames DS, Girard L, Gao B, Sato M et al. A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies. *PLoS Med* 2006;3:e486.
218. Lerman MI, Minna JD. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res* 2000;60:6116-6133.
219. Agathangelou A, Cooper WN, Latif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res* 2005;65:3497-3508.
220. Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, Martinez A et al. Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene* 2001;20:1509-1518.
221. Yeo W, Wong WL, Wong N, Law BK et al. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in tumorous and non-tumorous tissue of breast cancer. *Pathology* 2005;37:125-130.
222. Yoon JH, Dammann R, Pfeifer GP. Hypermethylation of the CpG island of the RASSF1A gene in ovarian and renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001;94:212-217.
223. Katoh H, Shibata T, Kokubu A, Ojima H et al. Epigenetic instability and chromosomal instability in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2006;168:1375-1384.
224. Marsit CJ, Karagas MR, Schned A, Kelsey KT. Carcinogen exposure and epigenetic silencing in bladder cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1076:810-821.
225. Donninger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci* 2007;120:3163-3172.
226. Lusher ME, Lindsey JC, Latif F, Pearson AD et al. Biallelic epigenetic inactivation of the RASSF1A tumor suppressor gene in medulloblastoma development. *Cancer Res* 2002;62:5906-5911.
227. Lee MG, Kim HY, Byun DS, Lee SJ et al. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:6688-6692.
228. Jeronimo C, Henrique R, Hoque MO, Mambo E et al. A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:8472-8478.
229. Rush JW, Sandiford SD. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. *Clin Biochem* 2003;36:345-351.
230. Yu YP, Yu G, Tseng G, Cieply K et al. Glutathione peroxidase 3, deleted or methylated in prostate cancer, suppresses prostate cancer growth and metastasis. *Cancer Res* 2007;67:8043-8050.
231. Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Diebold J et al. Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. *Cancer Res* 2005;65:4218-4227.

232. McNamee CJ, Reed JE, Howard MR, Lodge AP et al. Promotion of neuronal cell adhesion by members of the IgLON family occurs in the absence of either support or modification of neurite outgrowth. *J Neurochem* 2002;80:941-948.
233. Cui Y, Ying Y, van HA, Ng KM et al. OPCML is a broad tumor suppressor for multiple carcinomas and lymphomas with frequently epigenetic inactivation. *PLoS One* 2008;3:e2990.
234. Reed JE, Dunn JR, du Plessis DG, Shaw EJ et al. Expression of cellular adhesion molecule 'OPCML' is down-regulated in gliomas and other brain tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007;33:77-85.
235. Wang L, Zhu JS, Song MQ, Chen GQ et al. Comparison of gene expression profiles between primary tumor and metastatic lesions in gastric cancer patients using laser microdissection and cDNA microarray. *World J Gastroenterol* 2006;12:6949-6954.
236. Sellar GC, Watt KP, Rabiasz GJ, Stronach EA et al. OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer. *Nat Genet* 2003;34:337-343.
237. Tsou JA, Galler JS, Siegmund KD, Laird PW et al. Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma. *Mol Cancer* 2007;6:70.
238. Bumber YA, Kondo Y, Chen X, Shen L et al. RIL, a LIM gene on 5q31, is silenced by methylation in cancer and sensitizes cancer cells to apoptosis. *Cancer Res* 2007;67:1997-2005.
239. Vanaja DK, Ballman KV, Morlan BW, Cheville JC et al. PDLIM4 repression by hypermethylation as a potential biomarker for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:1128-1136.
240. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-122.
241. Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L et al. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* 1998;75:246-253.
242. Imren S, Kohn DB, Shimada H, Blavier L et al. Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 retroviral-mediated gene transfer in vivo inhibits tumor growth and invasion. *Cancer Res* 1996;56:2891-2895.
243. DeClerck YA, Perez N, Shimada H, Boone TC et al. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res* 1992;52:701-708.
244. Mohanam S, Wang SW, Rayford A, Yamamoto M et al. Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases: negative regulators of human glioblastoma invasion in vivo. *Clin Exp Metastasis* 1995;13:57-62.
245. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R et al. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 2002;31:141-149.
246. Kumagai T, Akagi T, Desmond JC, Kawamata N et al. Epigenetic regulation and molecular characterization of C/EBPalpha in pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 2009;124:827-833.
247. Pulukuri SM, Patibandla S, Patel J, Estes N et al. Epigenetic inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) gene in human prostate tumors. *Oncogene* 2007;26:5229-5237.
248. Arai H, Nakao K, Takaya K, Hosoda K et al. The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J Biol Chem* 1993;268:3463-3470.

249. Shin MK, Levorse JM, Ingram RS, Tilghman SM. The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature* 1999;402:496-501.
250. Tsutsumi M, Liang G, Jones PA. Novel endothelin B receptor transcripts with the potential of generating a new receptor. *Gene* 1999;228:43-49.
251. Nelson JB, Lee WH, Nguyen SH, Jarrard DF et al. Methylation of the 5' CpG island of the endothelin B receptor gene is common in human prostate cancer. *Cancer Res* 1997;57:35-37.
252. Chen SC, Lin CY, Chen YH, Fang HY et al. Aberrant promoter methylation of EDNRB in lung cancer in Taiwan. *Oncol Rep* 2006;15:167-172.
253. Zhao BJ, Sun DG, Zhang M, Tan SN et al. Identification of aberrant promoter methylation of EDNRB gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2009;22:55-61.
254. Lo KW, Tsang YS, Kwong J, To KF et al. Promoter hypermethylation of the EDNRB gene in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2002;98:651-655.
255. Hsu LS, Lee HC, Chau GY, Yin PH et al. Aberrant methylation of EDNRB and p16 genes in hepatocellular carcinoma (HCC) in Taiwan. *Oncol Rep* 2006;15:507-511.
256. Jeronimo C, Henrique R, Campos PF, Oliveira J et al. Endothelin B receptor gene hypermethylation in prostate adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2003;56:52-55.
257. Byrnes K, White S, Chu Q, Meschonat C et al. High eIF4E, VEGF, and microvessel density in stage I to III breast cancer. *Ann Surg* 2006;243:684-690.
258. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S et al. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1603-1612.
259. El-Gohary YM, Silverman JF, Olson PR, Liu YL et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol* 2007;127:572-579.
260. Lissbrant IF, Stattin P, Damber JE, Bergh A. Vascular density is a predictor of cancer-specific survival in prostatic carcinoma. *Prostate* 1997;33:38-45.
261. Mazzucchelli R, Montironi R, Santinelli A, Lucarini G et al. Vascular endothelial growth factor expression and capillary architecture in high-grade PIN and prostate cancer in untreated and androgen-ablated patients. *Prostate* 2000;45:72-79.
262. Trojan L, Thomas D, Friedrich D, Grobholz R et al. Expression of different vascular endothelial markers in prostate cancer and BPH tissue: an immunohistochemical and clinical evaluation. *Anticancer Res* 2004;24:1651-1656.
263. Vartanian RK, Weidner N. Endothelial cell proliferation in prostatic carcinoma and prostatic hyperplasia: correlation with Gleason's score, microvessel density, and epithelial cell proliferation. *Lab Invest* 1995;73:844-850.
264. Volavsek M, Masera A, Ovcak Z. Incidental prostatic carcinoma. A predictive role of neoangiogenesis and comparison with other prognostic factors. *Pathol Oncol Res* 2000;6:191-196.
265. Gettman MT, Bergstralh EJ, Blute M, Zincke H et al. Prediction of patient outcome in pathologic stage T2 adenocarcinoma of the prostate: lack of significance for microvessel density analysis. *Urology* 1998;51:79-85.

266. Erbersdobler A, Isbarn H, Dix K, Steiner I et al. Prognostic value of microvessel density in prostate cancer: a tissue microarray study. *World J Urol* 2010;28:687-692.
267. Loges S, Clausen H, Reichelt U, Bubenheim M et al. Determination of microvessel density by quantitative real-time PCR in esophageal cancer: correlation with histologic methods, angiogenic growth factor expression, and lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 2007;13:76-80.
268. Parker BS, Argani P, Cook BP, Liangfeng H et al. Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 2004;64:7857-7866.
269. Martin TA, Watkins G, Lane J, Jiang WG. Assessing microvessels and angiogenesis in human breast cancer, using VE-cadherin. *Histopathology* 2005;46:422-430.
270. Sagara Y, Mimori K, Yoshinaga K, Tanaka F et al. Clinical significance of Caveolin-1, Caveolin-2 and HER2/neu mRNA expression in human breast cancer. *Br J Cancer* 2004;91:959-965.
271. Sager R, Sheng S, Anisowicz A, Sotiropoulou G et al. RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994;59:537-546.
272. Koleske AJ, Baltimore D, Lisanti MP. Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1381-1385.
273. Schlomm T, Luebke AM, Sultmann H, Hellwinkel OJ et al. Extraction and processing of high quality RNA from impalpable and macroscopically invisible prostate cancer for microarray gene expression analysis. *Int J Oncol* 2005;27:713-720.
274. Bachmann N, Haeusler J, Luedeke M, Kuefer R et al. Expression changes of CAV1 and EZH2, located on 7q31 approximately q36, are rarely related to genomic alterations in primary prostate carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;182:103-110.
275. Waalkes S, Eggers H, Blasig H, Atschekzei F et al. Caveolin 1 mRNA is overexpressed in malignant renal tissue and might serve as a novel diagnostic marker for renal cancer. *Biomark Med* 2011;5:219-225.
276. Tang Y, Zeng X, He F, Liao Y et al. Caveolin-1 is related to invasion, survival, and poor prognosis in hepatocellular cancer. *Med Oncol* 2011.
277. Wernert N. The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Arch* 1997;430:433-443.
278. Wernert N, Locherbach C, Wellmann A, Behrens P et al. Presence of genetic alterations in microdissected stroma of human colon and breast cancers. *Anticancer Res* 2001;21:2259-2264.
279. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001;411:375-379.
280. Condon MS, Bosland MC. The role of stromal cells in prostate cancer development and progression. *In Vivo* 1999;13:61-65.
281. Camps JL, Chang SM, Hsu TC, Freeman MR et al. Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:75-79.
282. Olumi AF, Dazin P, Tlsty TD. A novel coculture technique demonstrates that normal human prostatic fibroblasts contribute to tumor formation of LNCaP cells by retarding cell death. *Cancer Res* 1998;58:4525-4530.
283. Di Vizio D, Morello M, Sotgia F, Pestell RG et al. An absence of stromal caveolin-1 is associated with advanced prostate cancer, metastatic disease and epithelial Akt activation. *Cell Cycle* 2009;8:2420-2424.

284. Witkiewicz AK, Dasgupta A, Sotgia F, Mercier I et al. An absence of stromal caveolin-1 expression predicts early tumor recurrence and poor clinical outcome in human breast cancers. *Am J Pathol* 2009;174:2023-2034.
285. Sloan EK, Ciocca DR, Pouliot N, Natoli A et al. Stromal cell expression of caveolin-1 predicts outcome in breast cancer. *Am J Pathol* 2009;174:2035-2043.
286. Witkiewicz AK, Dasgupta A, Nguyen KH, Liu C et al. Stromal caveolin-1 levels predict early DCIS progression to invasive breast cancer. *Cancer Biol Ther* 2009;8:1071-1079.
287. Koo JS, Park S, Kim SI, Lee S et al. The impact of caveolin protein expression in tumor stroma on prognosis of breast cancer. *Tumour Biol* 2011.
288. Wiechen K, Diatchenko L, AgoulNIK A, Scharff KM et al. Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 2001;159:1635-1643.
289. Wiechen K, Sers C, AgoulNIK A, Arlt K et al. Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas. *Am J Pathol* 2001;158:833-839.
290. Shridhar V, Sun QC, Miller OJ, Kalemkerian GP et al. Loss of heterozygosity on the long arm of human chromosome 7 in sporadic renal cell carcinomas. *Oncogene* 1997;15:2727-2733.
291. Huang HJ, Qian CP, Jenkins RB, Smith DI. Fish mapping of YAC clones at human chromosomal band 7q31.2: Identification of YACS spanning FRA7G within the common region of LOH in breast and prostate cancer. *Genes Chromosomes & Cancer* 1998;21:152-159.
292. Bieche I, Champeme MH, Matifas F, Hacene K et al. Loss of Heterozygosity on Chromosome-7Q and Aggressive Primary Breast-Cancer. *Lancet* 1992;339:139-143.
293. Zenklusen JC, Bieche I, Lidereau R, Conti CJ. (C-A)(N) Microsatellite Repeat D7S522 Is the Most Commonly Deleted Region in Human Primary Breast-Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91:12155-12158.
294. Champeme MH, Bieche I, Beuzelin M, Lidereau R. Loss of Heterozygosity on 7Q31 Occurs Early During Breast Tumorigenesis. *Genes Chromosomes & Cancer* 1995;12:304-306.
295. Zenklusen JC, Thompson JC, Troncso P, Kagan J et al. Loss of Heterozygosity in Human Primary Prostate Carcinomas - A Possible Tumor-Suppressor Gene at 7Q31.1. *Cancer Research* 1994;54:6370-6373.
296. Takahashi S, Shan AL, Ritland SR, Delacey KA et al. Frequent Loss of Heterozygosity at 7Q31.1 in Primary Prostate-Cancer Is Associated with Tumor Aggressiveness and Progression. *Cancer Research* 1995;55:4114-4119.
297. Jenkins R, Takahashi S, DeLacey K, Bergstralh E et al. Prognostic significance of allelic imbalance of chromosome arms 7q, 8p, 16q, and 18q in stage T3N0M0 prostate cancer. *Genes Chromosomes & Cancer* 1998;21:131-143.
298. Zenklusen JC, Thompson JC, Klein-Szanto AJ, Conti CJ. Frequent loss of heterozygosity in human primary squamous cell and colon carcinomas at 7q31.1: evidence for a broad range tumor suppressor gene. *Cancer Res* 1995;55:1347-1350.
299. Zenklusen JC, Weitzel JN, Ball HG, Conti CJ. Allelic Loss at 7Q31.1 in Human Primary Ovarian Carcinomas Suggests the Existence of A Tumor-Suppressor Gene. *Oncogene* 1995;11:359-363.

300. Koike M, Takeuchi S, Yokota J, Park S et al. Frequent loss of heterozygosity in the region of the D7S523 locus in advanced ovarian cancer. *Genes Chromosomes & Cancer* 1997;19:1-5.
301. Achille A, Biasi MO, Zamboni G, Bogina G et al. Chromosome 7q allelic losses in pancreatic carcinoma. *Cancer Research* 1996;56:3808-3813.
302. Laxman R, Currie JL, Kurman RJ, Dudzinski M et al. Cytogenetic Profile of Uterine Sarcomas. *Cancer* 1993;71:1283-1288.
303. Liscovitch M, Burgermeister E, Jain N, Ravid D et al. Caveolin and cancer: A complex relationship. In: *Membrane microdomain signaling: Lipid rafts in biology and medicine*. M.P. Mattson (ed) Humana press, Totowa, 2005;161-190.
304. Ravid D, Maor S, Werner H, Liscovitch M. Caveolin-1 inhibits anoikis and promotes survival signaling in cancer cells. *Adv Enzyme Regul* 2006;46:163-175.
305. Shatz M, Liscovitch M. Caveolin-1 and cancer multidrug resistance: coordinate regulation of pro-survival proteins? *Leuk Res* 2004;28:907-908.
306. Nasu Y, Timme TL, Yang G, Bangma CH et al. Suppression of caveolin expression induces androgen sensitivity in metastatic androgen-insensitive mouse prostate cancer cells. *Nat Med* 1998;4:1062-1064.
307. Tahir SA, Yang G, Ebara S, Timme TL et al. Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61:3882-3885.
308. Li L, Yang G, Ebara S, Satoh T et al. Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:4386-4392.
309. Gould ML, Williams G, Nicholson HD. Changes in caveolae, caveolin, and polymerase 1 and transcript release factor (PTRF) expression in prostate cancer progression. *Prostate* 2010;70:1609-1621.
310. Liu J, Razani B, Tang S, Terman BI et al. Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells. Angiogenesis inhibitors block vascular endothelial growth factor-induced down-regulation of caveolin-1. *J Biol Chem* 1999;274:15781-15785.
311. Kiessling F, Kartenbeck J, Haller C. Cell-cell contacts in the human cell line ECV304 exhibit both endothelial and epithelial characteristics. *Cell Tissue Res* 1999;297:131-140.
312. Tahir SA, Park S, Thompson TC. Caveolin-1 regulates VEGF-stimulated angiogenic activities in prostate cancer and endothelial cells. *Cancer Biol Ther* 2009;8:2286-2296.
313. Li L, Ren C, Yang G, Goltsov AA et al. Caveolin-1 promotes autoregulatory, Akt-mediated induction of cancer-promoting growth factors in prostate cancer cells. *Mol Cancer Res* 2009;7:1781-1791.
314. Jackson BC, Nebert DW, Vasiliou V. Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Hum Genomics* 2010;4:194-201.
315. Sotgia F, Williams TM, Schubert W, Medina F et al. Caveolin-1 deficiency (-/-) conveys premalignant alterations in mammary epithelia, with abnormal lumen formation, growth factor independence, and cell invasiveness. *Am J Pathol* 2006;168:292-309.

316. Kunze E, Schlott T. High frequency of promoter methylation of the 14-3-3 sigma and CAGE-1 genes, but lack of hypermethylation of the caveolin-1 gene, in primary adenocarcinomas and signet ring cell carcinomas of the urinary bladder. *Int J Mol Med* 2007;20:557-563.
317. Cui J, Rohr LR, Swanson G, Speights VO et al. Hypermethylation of the caveolin-1 gene promoter in prostate cancer. *Prostate* 2001;46:249-256.

7 Anhang

7.1 TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms

Tab. 7-1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms

T	Primärtumor
Tx	keine Aussage zur Tumorausdehnung möglich
T1	klein, nicht tastbar, zufällig entdeckt bei Operation
T1a	weniger als 5% des Gewebes befallen
T1b	mehr als 5% des Gewebes befallen
T1c	Diagnostiziert durch Nadelbiopsie
T2	Tumor liegt innerhalb der Prostatakapsel
T2a	weniger als 50% eines Seitenlappens befallen
T2b	mehr als 50% eines Seitenlappens befallen
T2c	beide Seitenlappen befallen
T3	Tumor liegt bereits außerhalb der Prostatakapsel
T3a	Ausbreitung über Prostatakapsel ohne Befall der Samenblasen
T3b	Ausbreitung über Prostatakapsel mit Befall der Samenblasen
T4	Befall von Nachbarstrukturen (Infiltration), Tumor ist fixiert (unverschieblich)
N	Status der regionären Lymphknoten
Nx	keine Aussage möglich
N0	keine Metastasen vorhanden
N1	Metastasen vorhanden
M	Status der Fernmetastasen
Mx	keine Aussage möglich
M0	nicht nachweisbar
M1	Fernmetastasen nachweisbar
M1a	Fernmetastasen in anderen regionären Lymphknoten nachweisbar
M1b	Metastasen im Knochen
M1c	Metastasen in anderen Organen und/oder Strukturen nachweisbar
weitere mögliche Angaben:	
Gleason-Grad	Tumordifferenzierung (siehe Einleitung unter 1.1.1.1.2)
R	Residualtumor nach Behandlung
Rx	keine Beurteilung möglich
R0	kein Resttumor vorhanden
R1	Resttumor mikroskopisch nachweisbar
R2	Resttumor bei Operation oder auf Röntgenbild mit bloßem Auge erkennbar
L	Lymphgefäßinvasion
Lx	nicht bestimmbar
L0	keine Tumorzellen in Lymphgefäßen vorhanden
L1	Tumorzellen in Lymphgefäßen vorhanden
V	Veneninvasion
Vx	nicht bestimmbar
V0	Tumoreinbruch in Venen nicht nachweisbar
V1	Tumoreinbruch in Venen nachweisbar
Pn	perineurale Invasion
Pn0	kein Tumorzellbefall des Nerven umgebenden Gewebes
Pn1	Tumorzellbefall des Nerven umgebenden Gewebes

7.2 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden anhand der Primer3-Software erstellt (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) und von TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) bezogen.

Tab. 7-2: Oligonukleotide und Sonden für mRNA-Expressionsanalysen

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	UPL-Sonde
CD34	gtgaaattgactcagggcatc	cccctgtccttcttaaactcc	#1
CD105	ccactgcacttgccctaca	atggcagctctgtggtgtt	#64
CD31	gcaacacagtccagatagtcgt	gacctcaaaactgggcatcat	#26
CD144	aagcctctgattggcacagt	ctggcccttgctactggt	#58
CAV1	ttccttctcagttccctaaa	gggaacgggtagagatgtcc	#26
VEGFA	ccttgctgctctacctccac	ccacttcgtgatgattctgc	#64
VEGFR2	gtggaggagaagtcctcagt	tccaaggtcaggaagtccttatac	#35
CD146	cctgctggctgctgtcctc	cacttcagaagggtgtgtct	#22
ALAS1	tttggccaatgactcaac	aggcatggttcccagaatc	#64
HPRT1	tgatagatccattctatgactgtaga	aagacattctttccagtaaagttgag	#22
TUBA1B	ccttcgctcctaattcccta	agcaggcattgccaatct	#64

Tab. 7-3: Oligonukleotide für Bisulfit-Sequenzierung der CAV1-Promotorregion

Primer	Sequenz (5'-3')	Besonderheit	T _m	Amplikon-Größe
sCav-F1	tgtgtatattgttaaataatggataatttg	für bisulfitierte DNA	52,4	353
sCav-R1	ccatctctaccttaaaacacat	für bisulfitierte DNA	49,4	
sCav-F2	tatggataatattgttgataaaaatttta	für bisulfitierte DNA	52,9	236
sCav-R2	ccctataaaaaaatctatataaaacct	für bisulfitierte DNA	52,7	
sCav-F3	ggatagggtaggattgtggatt	für bisulfitierte DNA	54,1	275
sCav-R3	cacatccccaaaattctaaca	für bisulfitierte DNA	53,1	

Tab. 7-4: Oligonukleotide für Luziferase-Reportergeren-Assays

Primer	Forward (KpnI-Schnittstelle)	T _m	GC [%]	Länge	CpGs
Cav1-0F	ggGGTACCTaaggcagagatggaacttg	59,32	47,6	530	30 + 0
Cav1-1F	ggGGTACCccttcataaggatccaca	59,74	50,0	631	30 + 1
Cav1-2F	ggGGTACCgatgtaaacgagtgtcacaaa	57,66	40,9	680	30 + 2
Cav1-3F	ggGGTACCTaaattctgcatgcctgctt	59,87	38,1	723	30 + 3
Cav1-4F	ggGGTACCagacatttcagaaacggatgg	59,04	42,8	750	30 + 4
Cav1-5F	ggGGTACCagcgtttggagacatttca	60,64	45,0	760	30 + 5
Cav1-6F	ggGGTACCatttcgaagcgtttgggaga	61,99	45,0	767	30 + 6
Cav1-7F	ggGGTACCcctcacagccaagcacatta	59,86	50,0	951	30 + 7
	Reverse (SacI-Schnittstelle)				
Cav1-R	ggGAGCTCtggtggatgaaaactgtga	60,24	45,0		

Tab. 7-5: Oligonukleotide für die Klonierung der kodierenden Sequenz von CAV1

Primer	Sequenz	T _m	GC	Länge
forward (5'-3'; mit EcoRI-Schnittstelle)	ggGAATTCatgtctgggggcaaatagc	60,73	52,63	
reverse (5'-3'; mit BamHI-Schnittstelle)	ggGGATCCttatatttctttctgcaagttgatgc	60,05	30,77	537

Tab. 7-6: Oligonukleotide und Sonden für methylierungsspezifische PCR

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Sonde (5'-3')
ACTB	tggtgatggaggaggttagtaagt	aaccaataaaacctactctcccttaa	6FAM-accaccacccaacacacaataacaaacacaxt-PH
RARβ2	cgagaacgcgagcgattc	caaacttactcgaccaatccaacc	6FAM-tcggaacgtattcggaaggttttttgaagtattt-BBQ
APC	gaaccaaaaacgctcccat	ttatatgtcggttacgtgcgtttatat	6FAM-cccgtcgaaaaccgccgatta-BBQ
PITX2	Oligonukleotide enthalten im EpiTect MethyLight Assay: Hs_PITX2 (Qiagen)		
GSTP1	Oligonukleotide enthalten im LightMix GSTP1 Kit (Epigenomics)		

7.3 Vektorkarten

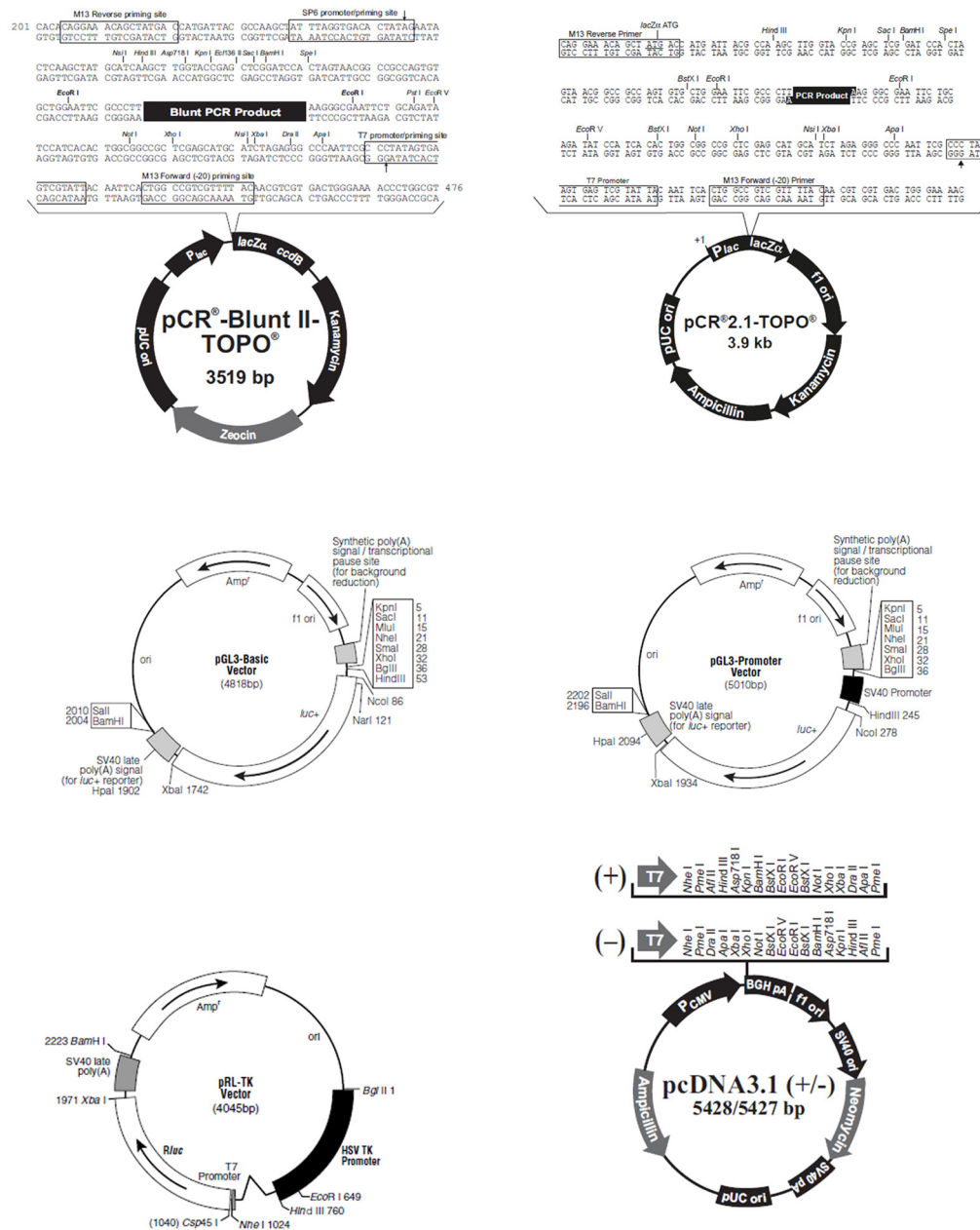


Abb. 7-1: Verwendete Vektoren mit den jeweiligen Sequenzreferenzpunkten. (Entnommen aus den jeweiligen Betriebsanweisungen der Hersteller)

7.4 Rezepte

Tab. 7-7: Puffer für Proteinisolierung und SDS-PAGE

Menge	Substanz	Menge	Substanz
<u>Ripa-Puffer zur Proteinisolierung</u>		<u>Trenngelpuffer, pH 8,8</u>	
150 mM	NaCl	1,5 M	Tris-Base
1%	NP-40	<u>Sammelgelpuffer, pH 6,8</u>	
0,5%	Natriumdesoxycholat	0,5 M	Tris-Base
0,1%	SDS	<u>2x Probenpuffer (2% SDS, nicht reduzierend)</u>	
50 mM	Tris base	0,125 M	Tris-Base
10 mM	PMSF	20%	Glycerin
1 mg/ml	Aprotinin	2%	SDS-Lösung
10 mg/ml	Soybean Trypsin Inhibitor	0,01%	Bromphenolblau
0,5 M	EDTA	ad 10 ml	Aqua bidest
<u>10x Laemmli-Laufpuffer, pH 8.3 – 8.8</u>		<u>2x Probenpuffer (2% SDS, reduzierend)</u>	
0,025 M	Tris base	1 ml nichtreduzierender 2x Probenpuffer	
0,192 M	Glycin	1 %	DTT (20 µl 4M DTT-Lsg.)
0,1%	SDS	<u>Kathodenpuffer</u>	
ad 1,0 Liter	Aqua bidest	25 mM	Tris base
<u>Anodenpuffer I</u>		40 mM	6-Aminocaprinsäure
25 mM	Tris base	<u>Anodenpuffer II</u>	
20 %	Methanol	300 mM	Tris base
<u>10x t-TBS, pH 7,5</u>		20 %	Methanol
100 mM	Tris base	<u>Stripping-Puffer</u>	
1 M	NaCl	10%	10x Laemmli-Laufpuffer
1,0%	Tween 20	20%	Methanol
ad 1,0 Liter	Aqua bidest	70%	Aqua dest.

Tab. 7-8: Puffer für immunhistochemische Analysen

Menge	Substanz	Menge	Substanz
<u>10x Citratpuffer, pH 6,0</u>		<u>10x TBS, pH 7,4 – 7,6</u>	
3,782 g	Zitronensäure	80 g	Natriumchlorid
24,11 g	Natrium-Citrat (2xH ₂ O)	24,2 g	Tris base
ad 1 Liter	Aqua bidest	ad 1 Liter	Aqua bidest
<u>10x EDTA-Puffer, pH 8,0</u>		<u>10x Tris-EDTA-Puffer</u>	
10 mM	EDTA	10 mM	Tris-Base
ad 1 Liter	Aqua bidest	1mM	EDTA
		ad 1 Liter	Aqua bidest

Tab. 7-9: Puffer für Zymographie

Menge	Substanz	Menge	Substanz
<u>4x Trenngelpuffer, pH 8,8</u>		<u>5x Inkubationspuffer (pH 7,5)</u>	
1,5 M	Tris base	250 mM	Tris-HCl
0,4%	SDS	750 mM	NaCl ₂
		50 mM	CaCl ₂
		(0,1%	NaN ₃)
		ad 500 ml	Aqua dest. (steril)
<u>4x Sammelgelpuffer, pH 6,8</u>		<u>0,2% Färbelösung</u>	
0,5 M	Tris base	0,5g	Coomassie Brillantblau
0,4%	SDS	250 ml	Entfärbelösung
<u>3x Gelatine-Lösung (0,3%)</u>		<u>Entfärbelösung</u>	
0,3 g	Gelatine	45%	Methanol
ad 100 ml	Aqua bidest	10%	Eisessig
		ad	Aqua dest
<u>5x Waschpuffer (pH 7,5)</u>		<u>Geltrocknungslösung</u>	
250 mM	Tris-HCl	5% Glycerin	
50 mM	CaCl ₂	ad Aqua dest.	
12,5%	Triton X-100		
(0,1%	NaN ₃)		
ad 500 ml	Aqua dest		

Tab. 7-10: Pipettierschema für Acrylamidgele für die SDS-PAGE

Trenngel	6%	8%	10%	12,5%	15%
Monomer Acrylamid:Bis=37,5:1	6 ml	8 ml	10 ml	12,5 ml	15 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
10% SDS	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
Aqua dest.	16,05 ml	14,05 ml	12,05 ml	9,55 ml	7,05 ml
10% APS	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
Totalvolumen	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml

Sammelgel (4,5%)	für 8 Gele	für 4 Gele	für 2 Gele
Monomer Acrylamid:Bis=37,5:1	3 ml	1,5 ml	0,75 ml
Sammelgelpuffer	5 ml	2,5 ml	1,25 ml
10% SDS	0,2 ml	0,1 ml	0,05 ml
Aqua dest.	11,7 ml	5,85 ml	2,925 ml
10% APS	0,1 ml	0,05 ml	0,025 ml
TEMED	10 µl	5 µl	2,5 µl
Totalvolumen	20 ml	10 ml	5 ml

Tab. 7-11: Pipettierschema für Gelatine-haltige Acrylamidgele für die Zymographie

Trenngel	7,5% Acrylamid 0,1% Gelatine	10% Acrylamid 0,1% Gelatine	12% Acrylamid 0,1% Gelatine
Monomer Acrylamid:Bis=37,5:1	1,31 ml	1,75 ml	2,1 ml
3x Gelatinestammlösung	2,33 ml	2,33 ml	2,33 ml
4x Trenngelpuffer	1,75 ml	1,75 ml	1,75 ml
Aqua dest.	1,58 ml	1,14 ml	0,79 ml
10% APS	21 µl	21 µl	21 µl
TEMED	10,5 µl	10,5 µl	10,5 µl
Totalvolumen	7 ml	7 ml	7 ml
Sammelgel (4,5%)	für 1 Gel	für 2 Gele	für 3 Gele
Monomer Acrylamid:Bis=37,5:1	0,25 ml	0,5 ml	0,75 ml
4x Sammelgelpuffer	0,5 ml	1 ml	1,5 ml
Aqua dest.	1,24 ml	2,482 ml	3,72 ml
10% APS	6 µl	12 µl	18 µl
TEMED	3 µl	6 µl	9 µl
Totalvolumen	2 ml	3,5 ml	6 ml

7.5 Sequenz des CAV1-Promotors für Luziferase-Reportergen-Assays

Zur Herstellung von CAV1-Promotor-Konstrukten mit unterschiedlicher CpG-Anzahl wurde folgende DNA-Sequenz zu Grunde gelegt:

GenBank: AC006159.3, Position 29250-3995; Homo Sapiens Caveolin-1 Gen, Promotorregion sowie ein Teil des Exon 1; **CG**, untersuchte CpG-Dinukleotide

CGCTATCACATTTTTTTTTAAGTCTAGTCAATTAGAAAAGTCAAATCTTTCCTCACAGCCAAGCACATTAAAAAAAATCTT
CTCTGGTAATAAACTGAAGCTTTAAATAATTCTACAATTATAAACATTTTGTGTATTTGCAAATATGGCATAACCTGTT
GGCATAAAATTCCATTGTTCCAGAAAATAT**CG**GTAATAAAATTATAGAAAAGTTAAAGATCTTCATTTCTTATTT**CG**AAGC
GTTTGGGAGACATTTTCAGAAA**CG**GATGGGAAATGTTAAATTCTGCATGCCTGCTTAAGTTTCCATCCACAC**CG**ACTAGATG
TAAAC**CG**AGTGTCACCAAAAGTACACCACAGGCACCCACACAGATTCCTTCCATAAGGGATCCACAAAGTTTAGATGTGAAA
TGTACCTAAAGGTTCTAGC**CG**TCTTTCATCCCTCCCTCTGTGAAACAGGGAGACACATGTGTTTTAAGGCAGAGATGGAA
CTTGGG**CG**ATGGG**CG**GGGGTGGGGGAGGTGGGAAGGG**CG**GCTTAGGACAGGGCAGGATTGTGGATTGTTTTCTG**CG**CCT
TGTTTGGCCATACTGGGCATCTCTGCAGG**CG**CGT**CG**GCTCCCTCCACCCCTGCTGAGATGATGCACTG**CG**AAAACATT**CG**C
TCTCCC**CG**GG**CG**CCTCT**CG**GTGGTTCAGAGCAGGGAAAATGTTGCCTCAGGTTTAAATAATCTGCCCAAGCACCC**CG**C
CGGGGAGAAA**CG**TTCTCACT**CG**CTCTCTGCT**CG**CTG**CG**GG**CG**CTCCC**CG**CCCTCTGCTGCCAGAACCTTGGGGATGTGCCT
AGACC**CG**G**CG**CAGCAC**CG**TC**CG**GGCCAAC**CG**CGAGCAGAACAAACCTTTGG**CG**GG**CG**GCCAGGAGGCTCCCTCCAGCCA
CGCCCCCTCCAG**CG**CTTTTTTTCCCCCATAACAATACAAGATCTTCTTCCTCAGTTCCCTTAAAGCACAGCCAGGG
AAACCTCCTCACAGTTTTTCATCCAGCC**CG**GGCCAGCATGTCTGGGGGCAAATACGTAGACTCGGAGGTAGGCATCCGTGG
GGGGGCGCCGGCTCGGG

7.6 Sequenz des CAV1-Promotors nach Bisulfit-Behandlung für Bisulfitsequenzierung

GenBank: AC006159.3, Position 29250-3995; Homo Sapiens Caveolin-1 Gen, Promotorregion sowie ein Teil des Exon 1; **CG**, untersuchte CpG-Dinukleotide

```
CGTTATTATATTTTTTTTAAAGTTTAGTTAATTAGAAAAGTTAAATTTTTTTTATAGTTAAGTATATTAAAAAAATTTT
TTTTGGTAATAAATTTGAAGTTTAAATAATTTTATAATTATAAATATTTTGTGTATTTTGTAAATATGGTATAATTTGTT
GGTATAAAATTTTATTGTTTTAGAAAATATCGGTAATAAAATTATAGAAAAGTTAAAGATTTTATTTTTTATTTCGAAGC
GTTTGGGAGATATTTTAGAAACGGATGGGAAATGTTAAATTTGTATGTTTGTAAAGTTTTATTTATATCGATTAGATG
TAAACGAGTGTTATTAAAAAGTATATTATAGGTATTTATATAGATTTTTTTTATAAGGGATTATAAAGTTTAGATGTGAAA
TGTATTTAAAGGTTTTTAGTCGTTTTTTATTTTTTTTTTGTGAAATAGGGAGATATATGTGTTTTAAGGTAGAGATGGAA
TTTGGGCGATGGGCGGGGGGTGGGGGAGGTGGGAAGGGACGGTTTAGGATAGGGTAGGATTGTGGATTGTTTTTGTCGTTT
TGTTTGTTTATATTGGGTATTTTTGTAGGCGCGTCGGTTTTTTTTATTTTTTGTGAGATGATGTATTCGAAAAATATTCGT
TTTTTTCGGGCGTTTTTTCGGTGGTTTAGAGTAGGGAAAATGTTGTTTTAGGTTTAAATAATTTGTTTAAGTATTTTAGC
GCGGGAGAAACGTTTTTTATCGTTTTTTGTTCGTTGCGGGCGTTTTTTCGTTTTTTGTTGTTAGAATTTGGGGATGTGTTT
AGATTCGGCGTAGTATACGTTCCGGTTAATCGCGAGTAGAATAAATTTTTTGGCGGGCGGTTAGGAGGTTTTTTTTTAGTTA
TCGTTTTTTTTTAGCGTTTTTTTTTTTTTTTATATAATATAAGATTTTTTTTTTTTAGTTTTTTAAAGTATAGTTTAGGG
AAATTTTTTTATAGTTTTTATTAGTTACGGGTAGTATGTTGGGGGTAAATACGTAGATTCGGAGGTAGGTATTCGTGG
GGGGCGGTTGGTTTGGG
```

7.7 Kodierende Sequenz von CAV1 für Überexpression in LNCaP

Zur Herstellung eines CAV1-exprimierenden Vektors wurde folgende kodierende Sequenz des CAV1-Gens zu Grunde gelegt:

GenBank: NG_012051.1; Position: 5279-5308, 6741-6905, 39162-39503; Homo sapiens caveolin 1, caveolae protein, 22kDa (CAV1), RefSeqGene on chromosome 7

```
ATGTCTGGGGGCAAATACGTAGACTCGGAGGGACATCTCTACACCGTTCCCATCCGGGAACAGGGCAACATCTACAAGCCC
AACAACAAGGCCATGGCAGACGAGCTGAGCGAGAAGCAAGTGACGACGCGCACACCAAGGAGATCGACCTGGTCAACCGC
GACCCTAAACACCTCAACGATGACGTGGTCAAGATTGACTTTGAAGATGTGATTGCAGAACCAGAAGGGACACACAGTTTT
GACGGCATTTGGAAGGCCAGCTTCACCACCTTCACTGTGACGAAATACTGGTTTTACCGCTTGCTGTCTGCCCTCTTTGGC
ATCCCGATGGCACTCATCTGGGGCATTACTTCGCCATTCTCTTTCTGACATCTGGGCAGTTGTACCATGCATTAAG
AGCTTCCTGATTGAGATTCAGTGCATCAGCCGTGTCTATTCCATCTACGTCCACACCGTCTGTGACCCACTCTTTGAAGCT
GTTGGGAAAATATTCAGCAATGTCCGCATCAACTGCAGAAAGAAATATAA
```

7.8 Informationen zu den verwendeten Genen

Tab. 7-12: Name, Referenznummer, sowie mRNA-Größen aller untersuchten Gene

Gen	Name	Referenznummer	mRNA-Größe (bp)
CD31	Homo sapiens platelet/endothelial cell adhesion molecule (PECAM1)	NM_000442	3754
CD34	Homo Sapiens CD34 molecule (CD34)	NM_001025109	2621
CD105	Homo Sapiens Endoglin (ENG)	NM_001114753, NM_000118	3072
CD144	Homo sapiens cadherin 5, type 2 (vascular endothelium) (CDH5)	NM_001795	4134
CD146	Homo sapiens melanoma cell adhesion molecule MCAM)	NM_006500	3332
VEGFA	Homo sapiens vascular endothelial growth factor A (VEGFA)	NM_001025366, NM_003376, NM_001025367, NM_001025368, NM_001025369, NM_001025370, NM_001033756	3665
VEGFR2	Homo sapiens kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)(KDR)	NM_002253	5830
CAV1	Homo sapiens caveolin 1, caveolae protein, 22kDa (CAV1)	NM_001753	2704
HPRT1	Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)	NM_000194	1435
ALAS1	Homo sapiens aminolevulinate, delta-, synthase 1 (ALAS1)	NM_000688 NM_199166	2407
TUBA1B	Homo sapiens tubulin, alpha 1b (TUBA1B)	NM_006082	1771

7.9 Effizienzen und Präzision der RT-qPCR-Messungen (Intra-Assay-Variation)

Tab. 7-13: Effizienzen und Präzision der RT-qPCR-Messungen zur Ermittlung der Intra-Assay-Variation. SD, Standardabweichung; S(%), entspricht SD*100/Mittelwert

Gen	Effizienz	Cq			Konzentration (arbiträre Einheit)			Anzahl der Messungen
		Mittelwert	SD	S(%)	Mittelwert	SD	S(%)	
CD31	1,933	27,24	0,04	0,16	1,01E-01	3,16E-03	3,13	5
CD34	1,945	27,26	0,07	0,24	5,32E-01	2,36E-02	4,43	5
CD105	2,005	26,46	0,07	0,26	9,72E-02	4,43E-03	4,56	5
CD144	1,875	28,19	0,05	0,16	5,07E-01	1,33E-02	2,61	5
CD146	1,944	27,82	0,05	0,19	9,50E-02	3,35E-03	3,52	5
VEGFA	1,820	24,44	0,20	0,81	9,07E-02	1,06E-02	11,64	5
VEGFR2	1,946	28,69	0,08	0,28	1,02E-01	5,70E-03	5,61	5
CAV1	1,812	28,19	0,07	0,24	1,01E-01	4,95E-03	4,89	5
HPRT1	1,836	26,34	0,15	0,40	9,46E-02	6,03E-03	6,37	5
ALAS1	1,920	26,30	0,11	0,57	1,19E-02	1,11E-03	9,36	5
TUBA1B	1,942	24,75	0,23	0,93	1,16E-02	1,86E-03	16,05	5

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich all denen danken, die mir die Promotion ermöglichten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen:

Mein besonderer Dank gilt der Stiftung Urologische Forschung, besonders Prof. Dr. Loening und Prof. Dr. Schnorr, die mir in den letzten drei Jahren durch ein Promotionsstipendium die Möglichkeit gaben, mein Promotionsvorhaben voranzutreiben.

Gleichermaßen möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung danken, die er mir trotz seiner neuen Position als Institutsdirektor der Pathologie in Rostock stets entgegenbrachte. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. med. Michael Lein für die Begutachtung meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Andreas Herrmann, der mir durch seine Bereitschaft, als Doktorvater und Gutachter zu fungieren, die Promotion an der naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität Berlin ermöglichte.

Prof. Dr. med. Klaus Jung danke ich sehr für sein stetes Interesse an meiner Arbeit, seinen Denkanstößen und der Begutachtung meiner Dissertation.

Vielen Dank an Frau Dr. rer. medic Monika Jung und Silke, die mich in die Gefilden der quantitativen Real-Time PCR einarbeiteten und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Dem gesamten Team der Urologischen Forschungsabteilung danke ich für jegliche Hilfestellungen und Unterstützung.

Vielen Dank an Annika, die mit mir von Anfang an den Laboralltag bestritt und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke, dass ich Deine Hochzeit miterleben durfte!

Nadine und Julia, es war toll, die letzten Monate mit Euch zusammen gearbeitet zu haben. Ich werde unsere täglichen Mensa Nord-Gänge sehr vermissen!

Ein riesengroßes Dankeschön an Zofia, die in den richtigen Momenten die richtigen Worte fand, mich stets mit Witz auch aus der noch so tiefsten Krise half und mir zeigte, was wirklich wichtig im Leben ist.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mum, die mir das Studium überhaupt erst ermöglichte und immer für mich da ist.

Carmen, was wäre ich nur ohne Deine guten Worte! Trotz der Entfernung kann ich immer auf Dich zählen, ich danke Dir Schwesterherz!

Und Martin, was wäre ich nur ohne Dich. Ich danke Dir für Deine Unterstützung und Deine Geduld. Ich freue mich auf die Zukunft mit Dir!

Eigene Publikationen/Vorträge

Publikationen

- 1 **Steiner I**, Jung K, Miller K, Stephan C, Erbersdobler A (2012) Expression of endothelial factors in prostate cancer: A possible role of caveolin-1 for tumor progression. *Oncol Rep* 27(2):389-395
- 2 **Steiner I**, Jung K, Schatz P, Horns T, Wittschieber D, Lein M, Dietel M, Erbersdobler A (2010) Gene promoter methylation and its potential relevance in early prostate cancer diagnosis. *Pathobiology* 77:260-266
- 3 Jung M, Schaefer A, **Steiner I**, Kempkensteffen C, Stephan C, Erbersdobler A, Jung K (2010) Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clin Chem* 56:998-1006
- 4 Erbersdobler A, Isbarn H, Dix K, **Steiner I**, Schlomm T, Mirlacher M, Sauter G, Haese A (2010) Prognostic value of microvessel density in prostate cancer: a tissue microarray study. *World J Urol* 28:687-692
- 5 Erbersdobler A, Isbarn H, **Steiner I**, Schlomm T, Chun F, Mirlacher M, Sauter G (2009) Predictive value of prostate-specific antigen expression in prostate cancer: a tissue microarray study. *Urology* 74:1169-1173

Vorträge/Poster

- 1 **Steiner I**, Jung K, Schatz P, Lein M, Dietel M, Erbersdobler A (2009) Investigations on GSTP1 methylation in prostate cancer and benign prostatic tissue [Abstract G-55: 15th International AEK Cancer Congress: Congress Program and Abstracts 2009:S60]. 15th International AEK Cancer Congress, Berlin, 18.03.-20.03.2009
- 2 Erbersdobler A, Mirlacher M, **Steiner I**, Wittschieber D, Schlomm T, Isbarn H, Sauter G (2009) Prognostic impact of prostate-specific antigen (PSA) expression in prostate cancer tissue [Abstract Sa-041: *Pathologie* 2009;30 (suppl 1):S72]. 93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V. (und 13. Dreiländertagung der Zytologie), Freiburg, 04.06.-07.06.2009
- 3 **Steiner I**, Jung K, Schatz P, Horns T, Wittschieber D, Lein M, Dietel M, Erbersdobler A (2009) GSTP1 methylation in prostate carcinoma and adjacent, non-neoplastic prostatic tissue [Abstract Sa-045: *Pathologie* 2009;30 (suppl 1):S73]. 93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V. (und 13. Dreiländertagung der Zytologie), Freiburg, 04.06.-07.06.2009

- 4 **Steiner I**, Jung K, Schatz P, Wittschieber D, Lein M, Dietel M, Erbersdobler A (2010) Untersuchungen zur Gen-Promotormethylierung im Prostatakarzinom und benignem, prostatistischem Gewebe [Abstract V5.4: Urologe 2010;45:S109]. 1. Symposium "Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie", München, 12.11.-14.11.2009
- 5 Schaefer A, Jung M, **Steiner I**, Lein M, Erbersdobler A, Stephan C, Miller K, Jung K. Einfluss der Gesamt-RNA-Integrität auf die Quantifizierung von microRNAs [Abstract V2.1: Urologe 2010;49:S100]. 1. Symposium „Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie“, München, 12.11.-14.11.2009.
- 6 **Steiner I** (2009) Gen-Promotermethylierung im Prostatakarzinom und benignem, prostatistischem Gewebe. Institutsseminar am Institut für Pathologie, Campus Mitte, Charité-Universitätsmedizin, Berlin, 08.12.2009
- 7 **Steiner I**, Jung K, Lein M, Schlomm T, Sauter G, Rabien A, Dietel M, Erbersdobler A (2010) Endothelial factors in the prostate: Loss of Caveolin-1 correlates with tumour aggressiveness. Heinrich-Warner-Symposium, Hamburg, 24.02.-26.02.2010
- 8 **Steiner I**, Jung K, Lein M, Schlomm T, Sauter G, Rabien A, Dietel M, Erbersdobler A (2010) Endothelial factors in the prostate: Loss of Caveolin-1 in prostate cancer correlates with tumour aggressiveness [Abstract Fr-135: Pathologie 2010;31 (suppl 1):S57]. 94. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., Berlin, 27.05.-30.05.2010
- 9 **Steiner I**, Jung K, Schlomm T, Sauter G, Rabien A, Dietel M, Erbersdobler A. Endothelial factors in the prostate: Loss of Caveolin-1 in prostate cancer correlates with tumour aggressiveness and plays a putative role in signal transduction [accepted]. 2. Symposium „Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie“, Mainz, 11.11.-13.11.2010.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig von mir verfasst wurde und ich keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Ich versichere, dass diese Arbeit noch keiner wissenschaftlichen Institution vorgelegt wurde.

Isabel Steiner

Berlin, im Februar 2012